

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

DIEGO DE FREITAS COELHO

**Purificação de Bromelina dos Resíduos de Abacaxi (*Ananas comosus*
L. Merrill) por Precipitação integrada a Sistema Bifásico Aquoso
(PEG/Sulfato de Amônio) não Convencional**

Campinas - São Paulo

fevereiro de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:

SISTEMAS DE PROCESSOS QUÍMICOS E INFORMÁTICA

**Purificação de Bromelina dos Resíduos de Abacaxi (*Ananas
comosus* L. Merrill) por Precipitação integrada a Sistema
Bifásico Aquoso (PEG/Sulfato de Amônio) não Convencional**

Autor: Diego de Freitas Coêlho

Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

fevereiro de 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

C65p Coêlho, Diego de Freitas
Purificação de bromelina dos resíduos de abacaxi
(Ananas comosus L.Merril) por precipitação integrada a
sistema bifásico aquoso (PEG/Sulfato de amônio) não
convencional. / Diego de Freitas Coêlho. --Campinas,
SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Elias Basile Tambourgi.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Seleccione.

1. Purificação. 2. Enzimas. 3. Meio ambiente. I.
Tambourgi, Elias Basile. II. Universidade Estadual de
Campinas. Seleccione. III. Título.

Título em Inglês: Purification of the residue of bromelain from pineapple (Ananas
comosus l.Merril) by precipitation integrated into an aqueous (PEG /
ammonium sulfate) non conventional.

Palavras-chave em Inglês: Purification, Enzymes, Environment

Área de concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Roberto Rodrigues de Souza, Luiz Carlos Bertevello

Data da defesa: 14-02-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Esta versão corresponde à final da Dissertação de Mestrado defendida por Diego de Freitas Coêlho, em 14 de fevereiro de 2012 e aprovada pela banca examinadora:

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'E' followed by a series of loops and a final flourish.

Dr. Elias Basile Tambourgi – orientador

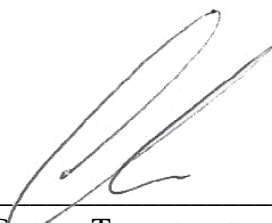
A handwritten signature in blue ink, featuring a large, stylized 'R' followed by a series of loops and a final flourish.

Dr. Roberto Rodrigues de Souza

A handwritten signature in blue ink, featuring a large, stylized 'L' followed by a series of loops and a final flourish.

Dr. Luiz Carlos Bertevello

Esta versão corresponde à final da Dissertação de Mestrado defendida por Diego de Freitas Coêlho, em 14 de fevereiro de 2012.



PROF. DR. ELIAS BASILE TAMBOURGI – ORIENTADOR

À minha mãe, Célia, pelo amor,
carinho, atenção e esforço para garantir
minha educação, dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Célia, pelo eterno apoio, incentivo e amor demonstrados em todos os momentos. Não existem palavras que expressem a sua importância em minha vida.

À minha família, em especial à minhas irmãs, Vanuci e Vanessa; à minha vó, Zélia Oliveira e aos meus tios, Neuza e Valdimiro, por todo o apoio e ajuda que me deram durante as dificuldades que vim a enfrentar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi pela oportunidade de realizar este trabalho; pelo eterno bom humor; por seus aconselhamentos durante o desenvolvimento da dissertação e por sua preciosa atenção e amizade.

Ao quasi-coorientador, Dr. Edgar Silveira, por me direcionar sempre que necessário; por todas as dúvidas sanadas; por todas as conversas que, agregando ou não valor a este trabalho, foram inestimáveis; e por ser um ótimo amigo.

Aos amigos que, conscientemente ou não, me ajudaram no início desta nova etapa da minha vida em Campinas: Conrado, Ivan, Julia, Karine e Milena. Além de todos os outros que frequentavam a “BioCasa” e que pude conviver durante minha permanência nesta.

Aos colegas Alessandro, Bruno, Débora, Flávio, Germano, Marcos, Saulo (além de muitos outros), pelo companheirismo nas disciplinas, almoços, momentos de estudos e todas as risadas que compartilhamos.

Aos colegas Iara, Juliana, Thayse e Petrus, do Laboratório de Processos de Separação II da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, pela troca de conhecimento constante.

Aos amigos da O-07: Eduardo, Mario, Vinícius e Rafael, pelo acolhimento; bom convívio e momentos de descontração.

À Prof. Dra. Marisa Beppu e ao técnico Celso Camargo (ambos do DTF/FEQ/UNICAMP), pela disponibilização do liofilizador e auxílio na realização das análises, respectivamente.

A todos os colegas e professores, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu agradecimento.

"Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá."

Ayrton Senna (1960-1994)

RESUMO

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de endopeptidases oriundas dos membros pertencentes à família Bromeliaceae, à qual pertence o abacaxi (*Ananas Comosus*). Devido aos importantes papéis fisiológicos que desempenham, estas enzimas oferecem um amplo espectro de aplicações terapêuticas comprovadas (ação anti-inflamatória, antitumoral; adjuvante na cicatrização; aumento na capacidade cardiorrespiratória, etc.), além de serem utilizadas por indústrias alimentícias no processamento de carnes. Atualmente, a bromelina é preparada através da ultrafiltração, centrifugação e liofilização do suco refrigerado de abacaxi, que produz um pó amarelado com 40% de teor de proteína e pouquíssima atividade biológica. Este trabalho se concentra em estudar a viabilidade da aplicação de sistemas bifásicos aquosos não convencionais na purificação da bromelina a partir do resíduo do processamento do abacaxi. Comparativamente aos sistemas bifásicos convencionais, esta técnica se difere devido à integração entre as metodologias convencionais de extração líquido-líquido e precipitação fracionada. Como resultado, têm-se uma redução do conteúdo proteico do extrato sem perda significativa de atividade através da remoção de moléculas indesejadas. Inicialmente avaliou-se a influência da massa molar e concentração do polímero utilizado, além da saturação de sulfato de amônio, no rendimento da recuperação da bromelina e no fator de purificação obtido. Posteriormente estas variáveis foram otimizadas através de dois planejamentos experimentais consecutivos. Os melhores resultados para o fator de purificação (11,80 vezes) e para o rendimento de recuperação da bromelina (87,36%) foram atingidos utilizando PEG com massa molar de 4000; concentração de PEG de 10,86% (m/m) e saturação de sulfato de amônio de 36,21%.

ABSTRACT

Bromelain is the general name given to the group of endopeptidases found in pineapple (*Ananas comosus*) as well as all proteases derived from members of the family Bromeliaceae. Due to its important physiological role, these enzymes offer a wide spectrum of proven therapeutic applications (anti-inflammatory, anticancer and fibrinolytic activities; reduction of healing time, increase of cardiorespiratory fitness, etc), besides being used for the meat processing in food industries. Nowadays, bromelain is prepared from cooled pineapple juice by centrifugation, ultrafiltration and lyophilisation. This process yields a yellowish powder with 40% of protein content. This paper focuses on the feasibility of unconventional aqueous two-phase systems (ATPS) for bromelain purification from pineapple processing waste. The main difference in comparison to conventional systems is the integration of the liquid-liquid extraction technique with fractional precipitation, which can decrease the protein content with no loss of biological activity by removing of unwanted molecules. The initial study evaluated the influence of molar mass and polymer concentration used, besides of ammonium sulphate saturation, in recovery yield of bromelain and achieved purification factor. Posteriorly, these variables were optimized through of two consecutives designs of experiments. The best results for the purification factor (11.80 times) and for recovery yield of bromelain (87.36%) were achieved using PEG with molecular weight of 4000, concentration of PEG of 10.86% (m / m) and ammonium sulfate saturation of 36.21%

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 | Introdução..... | 1 |
| 1.2 | Objetivos | 4 |
| 1.2.1 | Objetivo Geral | 4 |
| 1.2.2 | Objetivos Específicos | 4 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 5 |
| 2.1 | Abacaxi: Aspectos Principais, Mercado e Processamento. | 5 |
| 2.2 | Proteínas..... | 7 |
| 2.2.1 | Enzimas | 8 |
| 2.3 | Bromelina..... | 11 |
| 2.4 | Processos de Separação..... | 13 |
| 2.4.1 | Precipitação de Proteínas | 14 |
| 2.4.2 | Sistemas Bifásicos Aquosos..... | 18 |
| 2.4.3 | Fundamentos da Partição de Proteínas | 29 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 34 |
| 3.1 | Materiais | 34 |
| 3.2 | Métodos | 35 |
| 3.2.1 | Obtenção do Extrato Enzimático..... | 35 |
| 3.2.2 | Determinação de Proteínas | 35 |
| 3.2.3 | Determinação de Atividade Enzimática (<i>Aphase</i>) | 36 |
| 3.2.4 | Equações de Rendimento (<i>Yiphae</i>) | 37 |
| 3.2.5 | Fator de Purificação (<i>PF</i>)..... | 37 |
| 3.2.6 | Precipitação Fracionada com Sulfato de Amônio | 38 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.2.7 | Planejamento Experimental..... | 38 |
| 3.2.8 | Preparo dos Sistemas Bifásicos Aquosos..... | 40 |
| 4 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 42 |
| 5 | MANUSCRITOS | 51 |
| 5.1 | Studies on Bromelain Precipitation by Ethanol, Poly(Ethylene Glycol) and Ammonium Sulphate | 52 |
| 5.1.1 | Introduction | 53 |
| 5.1.2 | Materials and Methods | 54 |
| 5.1.3 | Results and Discussion..... | 55 |
| 5.1.4 | Conclusions | 57 |
| 5.1.5 | References | 58 |
| 5.2 | Purificação de Bromelina dos Resíduos de Abacaxi (<i>Ananas comosus</i>) por Sistemas Bifásicos Aquosos PEG/Sal | 60 |
| 5.2.1 | Introdução..... | 61 |
| 5.2.2 | Material e Métodos..... | 62 |
| 5.2.3 | Resultados e Discussões | 64 |
| 5.2.4 | Conclusões | 67 |
| 5.2.5 | Referências Bibliográficas | 68 |
| 5.3 | Bromelain Purification through Unconventional Aqueous Two-Phase System (PEG/Ammonium Sulphate)..... | 70 |
| 5.3.1 | Introduction | 71 |
| 5.3.2 | Material and Methods..... | 74 |
| 5.3.3 | Results and Discussion..... | 78 |
| 5.3.4 | Conclusions | 88 |
| 5.3.5 | References | 89 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 6 | CONCLUSÕES..... | 92 |
| 7 | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... | 93 |
| 8 | ANEXOS..... | 94 |
| 8.1 | Anexo I – Percentual de Saturação do Sulfato de Amônio a 0 °C. | 95 |
| 8.2 | Anexo II – Fluxograma do Processo Convencional e do uATPS para a Produção de Bromelina | 96 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Solvatação dos grupos hidrofóbicos por moléculas de água..... | 15 |
| Figura 2 – Curva de Solubilidade do Sulfato de Amônio para uma proteína hipotética (Evans et al., 2009) | 17 |
| Figura 3 – Diagrama de Fases Esquemático..... | 22 |
| Figura 4 – Diagrama de Fase para o Sistema PEG 10.000 e Dextrana Metacrilada (DexMA) 6.000 (Δ), 40.000 (\circ), 22.000 (\square) (Stenekes et al., 1999). | 26 |
| Figura 5 – Escala de hidrofobicidade dos principais polímeros utilizados em SBAs (Albertsson, 1986). | 32 |
| Figura 6: Diagrama Esquemático do Procedimento para Preparo dos Sistemas Bifásicos Aquosos | 41 |
| Figura 7 - Fator de purificação, fração de proteínas totais e de bromelina para os sistemas PEG/Fosfato e PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em suas respectivas condições ótimas..... | 66 |
| Figure 8 - Schematic of molecule distribution in unconventional aqueous two-phase system | 77 |
| Figure 9 - Fractional precipitation profile of bromelain from pineapple waste | 78 |
| Figure 10 - Precipitated proteins in uATPS | 80 |
| Figure 11 - Pareto chart of standardised effects for purification factor (<i>PFs</i>) in top phase. | 81 |
| Figure 12 - Pareto chart of standardised effects for bromelain yield in top phase (<i>YEt</i> (%)) | 81 |
| Figure 13 - Response contour of purification factor (A) and bromelain purification yield (B) | 82 |
| Figure 14 - Contour surface of desirability function for bromelain purification..... | 83 |

| | |
|--|----|
| Figure 15 - Response contour of quadratic fit of purification factor in central composite design..... | 85 |
| Figure 16 - Response contour of quadratic fit of bromelain purification factor in central composite design | 86 |
| Figure 17 - Surface (A) and contour (B) plots of desirability function of central composite design..... | 87 |
| Figure 18 - Comparative graph of predicted versus observed values in uATPS..... | 87 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Tipos de Sistemas Bifásicos. | 21 |
| Tabela 2: Equipamentos e Reagentes Utilizados no Trabalho | 34 |
| Tabela 3: Matriz de Planejamento Fatorial 2^3 realizado para estudar o efeito dos fatores escolhidos sobre o fator de purificação do processo. | 39 |
| Tabela 4: Matrix de Planejamento Fatorial Composto Central Esférico (2^2) com triplicata no ponto central. | 40 |
| Table 5: Effects of ammonium sulphate saturation on bromelain precipitation..... | 56 |
| Table 6: Effects of ethanol concentration on bromelain precipitation | 56 |
| Tabela 7: Planejamento Experimental Fatorial $2^4 + 3 \cdot P_C$, para o Fosfato, e $2^3 + 3 \cdot P_C$ para os demais sais..... | 64 |
| Tabela 8: Resultados da Purificação do Sistema PEG/Fosfato | 65 |
| Tabela 9: Resultados da Purificação da bromelina por Sistemas Bifásicos Aquosos PEG/(NH ₄) ₂ SO ₄ | 66 |
| Table 10 - 2^3 full factorial design of uATPS experiments | 80 |
| Table 11: 2^2 central composite design of uATPS (MMPEG 4000) | 83 |
| Table 12: Encoded variables and results of central composite design ($2^2 +$ three central points) | 84 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------------|---|
| ABS | Absorbância |
| AE | Atividade Específica |
| BSA | Albumina de Soro Bovino |
| DexMA | Dextrana Metacrilada |
| p_F^{phase} | Fator de Purificação |
| IUDMB | International Union of Biochemistry and Molecular Biology |
| PEG | Polietileno Glicol |
| MMPEG | Massa Molar do PEG |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| SBA | Sistema Bifásico Aquoso |
| TCA | Ácido Tricloroacético |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Introdução

O abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill), originário das Américas, é cultivado na Ásia, na África, nas Américas (Norte, central e Sul) e na Europa, sendo seu fruto consumido tanto na forma fresca como industrializada. O Brasil, um dos líderes mundiais em sua produção, cultiva mais de 70.000 hectares de abacaxi (Ibge, 2011).

O grande percentual de resíduos gerados durante a usinagem, cerca de 60% do peso total do fruto, contém quantidades apreciáveis de Bromelina, uma protease com inúmeras aplicações nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, que possui alto valor agregado e que, diferentemente da papaína, não desaparece quando o fruto amadurece (Sriwatanapongse et al., 2000), gerando assim um número crescente de estudos de processos de recuperação e purificação da mesma.

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de endopeptidases encontradas no abacaxi e, na verdade, a todas as proteases oriundas dos membros pertencentes à família Bromeliaceae (Kennedy et al., 2004). Seguindo esta definição, estas enzimas foram nomeadas com números sistemáticos IUDMB: EC 3.4.22.32 e EC 3.4.22.33, para a bromelina do talo e fruto, respectivamente (Kennedy et al., 2004).

A bromelina é utilizada em indústrias alimentícias, no processamento de carnes, e utilizada com fins terapêuticos onde tem ação comprovada na inibição da agregação plaquetária (Rowan et al., 1990); atividade fibrinolítica (Morita et al., 1979); ação anti-inflamatória (Harrach et al., 1998); ação antitumoral (Leung et al., 1980); modulação de citocininas e do sistema imune (White et al., 1988); adjuvante na absorção de drogas (Morita et al., 1979); assistência na digestão (De-Giuli et al., 1978; apud Silveira et al., 2009); adjuvante na cicatrização (Inoue et al., 1994); e aumento na capacidade cardiorrespiratória (Uhlir et al., 1981; apud Silveira et al., 2009).

Muito embora os processos de separação variem significativamente em função do tipo de molécula alvo, podendo requerer uma grande variedade de passos até atingir a purificação desejada, deve-se limitar o número de etapas e atingir o máximo de eficiência

de cada passo. Além disso, não há método definido ou previsto que permita ao pesquisador desenvolver um protocolo de biosseparação para uma proteína específica ou bioproduto (Wheelwright, 1989).

Cussler (1987) sugere, como base para a síntese de processos, quatro passos básicos: Remoção de Sólidos insolúveis, isolamento do produto, purificação e polimento. Os processos de biosseparação podem incluir lise celular, centrifugação, cromatografia, secagem, evaporação, extração, separação por membrana e precipitação (Silveira et al., 2009).

Atualmente, a bromelina é preparada através da ultrafiltração, centrifugação e liofilização do suco refrigerado de abacaxi. Este processo produz um pó amarelado com 40% de teor de proteína (Larocca et al., 2010).

A purificação e separação de proteínas baseadas nos princípios de partição em sistemas de duas fases aquosas têm sido alvo de muitos pesquisadores nos últimos anos, mas foi Albertsson que constatou que sistemas formados por polímeros solúveis e solventes orgânicos também possibilitam a partição de materiais biológicos, ou seja, permitiam que uma terceira substância introduzida no sistema fosse coletada, preferencialmente, numa das fases por ajuste de parâmetros físico-químicos (Ferreira, 2007). Esta técnica de extração parece ser especialmente adequada para as primeiras etapas dos procedimentos de separação, mas pode substituir etapas cromatográficas ou ser aplicada antes da cromatografia (Hustedt et al., 1985).

A purificação de grandes quantidades de proteínas requer o uso de técnicas, pelo menos nas etapas iniciais, com alta capacidade e baixo poder de resolução, como a precipitação fracionada utilizando sais ou solventes orgânicos (Doonan et al., 2004). Como reflexo da complexidade dos agrupamentos observados na superfície das proteínas (regiões polares, resíduos iônicos e fragmentos hidrofóbicos), os fatores que ditam sua solubilidade são igualmente complexos, uma vez que as interações entre estes grupos com o solvente não são completamente compreendidos. Alternativamente, o crescente interesse em produzir drogas a partir de extratos (animais ou vegetais) estimulou o desenvolvimento de novas estratégias de purificação, de modo a maximizar a recuperação dos produtos e tornar

os processos economicamente viáveis. Os benefícios dos Sistemas Bifásicos Aquosos (SBAs) são conhecidos e incluem, dentre outros, biocompatibilidade, elevada área de contato interfacial de operação e simplicidade de procedimentos. Estas técnicas de *downstream processing* são comumente utilizadas como etapas de concentração, reduzindo o volume e o conteúdo proteico do extrato a níveis manejáveis, e sendo purificado, portanto, por técnicas de alta resolução e baixa capacidade, como os processos cromatográficos (Doonan et al., 2004).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Purificar Bromelina a partir dos Resíduos de Abacaxi (*Ananas comosus*) por Precipitação integrada a Sistema Bifásico Aquoso (PEG/Sulfato de Amônio) não Convencional.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Estudar o processo de precipitação da bromelina proveniente do resíduo do processamento do abacaxi utilizando sulfato de amônio;
- Utilizar o planejamento Experimental para analisar o processo de extração de bromelina por sistemas bifásicos aquosos compostos por PEG (MM 2000,4000 e 6000) /Sulfato de Amônio;
- Avaliar os efeitos da integração do processo de precipitação fracionária a Sistemas bifásicos aquosos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Abacaxi: Aspectos Principais, Mercado e Processamento.

Este pseudofruto, da família *Bromeliaceae*, apresenta uma longa história de uso etnobotânico, associada aos povos americanos nativos, como fonte de fibras, alimentos, forragens e medicamentos, além de uso místico (Givnish et al., 2000). A popularidade obtida entre paisagistas e jardineiros justamente devido à sua beleza de suas formas e cores, além de diversas outras características, vem causando o declínio das populações naturais de algumas espécies (Manetti et al., 2009).

Apesar do nome desta família estar intimamente associado às bromélias, o abacaxi (*Ananas comosus*) é a espécie de *Bromeliaceae* mais conhecida, sendo inclusive considerado como uma das frutas tropicais mais populares do mundo. O abacaxi tornou-se muito popular principalmente pelo seu sabor e aroma marcantes.

Possui corpo geralmente cilíndrico ou ligeiramente cônico, constituído por 100 a 200 pequenas bagas ou frutinhos fundidos entre si sobre o eixo central ou coração. A polpa apresenta cor branca, amarela ou laranja-avermelhada, sendo o peso médio dos frutos de um quilo, dos quais 25% são representados pela coroa (Giacomelli et al., 1981; apud Granada et al., 2005).

Além de ser empregado como alimento, o abacaxi também é bastante utilizado na medicina popular. Ele apresenta reconhecidas propriedades medicinais, agindo como estomáquico, diurético e anti-inflamatório, sendo também indicado para problemas das vias respiratórias e para neurastenia (Manetti et al., 2009).

Ao lado das qualidades organolépticas, que o distinguem universalmente, há seu alto valor dietético, comparável ao das melhores frutas tropicais. O suco de abacaxi é um alimento energético, pois um copo do mesmo propicia cerca de 150 calorias ao organismo humano. O teor de açúcares varia em torno de 12 a 15%, dos quais aproximadamente 66% são de sacarose e 34% de açúcares redutores (Godoi, 2007).

O abacaxizeiro, originário das Américas, é cultivado na Ásia, na África, nas Américas (Norte, central e Sul) e na Europa, cuja projeção para 2010 estima menos de 4% da produção mundial. Cabendo à Tailândia, Filipinas, Brasil, Costa Rica e México as posições de destaque entre os principais países produtores (Fao, 2003).

No cenário nacional, o abacaxi é produzido em todos os estados da União e no Distrito Federal. Entre as variedades cultivadas, destacam-se a “Pérola” e a “*Smooth Cayenne*”. Em 2010, a produção nacional de abacaxi somou 1.413.352 toneladas de frutos, com decréscimo de 3,9% com relação ao ano anterior. A área colhida totalizou 54.069 hectares e o rendimento da cultura foi em média de $26.140 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ (Ibge, 2011).

A industrialização do fruto procura tirar o máximo de rendimento de sua matéria-prima em relação ao produto principal (fruta em calda) ou mesmo aos subprodutos, como é o caso dos resíduos fibrosos, utilizados na alimentação de ruminantes (Fao, 2003). Ao longo do processo, os frutos são lavados, selecionados por tamanho, descascados e fatiados, resultando na eliminação da matéria fibrosa e produção do suco e do produto em conserva.

O grande percentual de resíduos gerados durante a usinagem, cerca de 60% do peso total do fruto, contém quantidades apreciáveis de Bromelina, uma protease com inúmeras aplicações nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, que possui alto valor agregado e que, diferentemente da papaína, não desaparece quando o fruto amadurece (Balls et al., 1941), gerando assim um número crescente de estudos de processos de recuperação e purificação da mesma.

2.2 Proteínas

Gerardus Johannes Mulder (1802-1880) usou pela primeira vez o termo proteína (do grego *Proteios*, primeiro, primitivo) para se referir às substâncias albuminoides. Mas, na verdade, foi o sueco Jöns Jacob Berzelius (1779-1848), um dos mais importantes químicos da época, quem sugeriu o termo a Mulder, por acreditar que as substâncias albuminoides eram os constituintes fundamentais de todos os seres vivos, sendo responsáveis, então, pelo funcionamento das funções vitais dos organismos animais. As proteínas são moléculas orgânicas de alta massa molecular e de maior abundância nas células, representando cerca de 50 a 80% do peso seco das mesmas.

Cada tipo de molécula proteica tem, em seu estado nativo, uma configuração tridimensional peculiar, designada conformação. Dependendo da conformação, elas podem ser classificadas como fibrosas ou globulares.

As proteínas fibrosas são materiais hidrofóbicos e fisicamente resistentes. São constituídas de cadeias polipeptídicas dispostas paralelamente ao longo de um único eixo, formando longas fibras ou lâminas. As proteínas fibrosas são os elementos estruturais básicos do tecido conjuntivo dos animais superiores.

As proteínas globulares, por sua vez, são solúveis em sistemas aquosos e se difundem rapidamente. Suas cadeias polipeptídicas são firmemente arranjadas em forma esférica ou globular compacta. As proteínas globulares usualmente tem uma função dinâmica ou móvel. Quase todas as enzimas, por exemplo, são proteínas globulares, das quais se podem citar a soroalbumina e a hemoglobina, cujas funções são de transporte.

Em condições fisiológicas idênticas, todas as moléculas de uma mesma proteína apresentam a mesma conformação, denominada nativa. Essa é a conformação mais estável que podem assumir naquelas condições e reflete um equilíbrio delicado entre as interações ocorridas no interior da molécula proteica e entre essa e seu ambiente. Ao proceder-se o isolamento e purificação de uma proteína, alterações físico-químicas são estabelecidas no seu meio, podendo afetar sua estrutura espacial e ocasionar a perda de sua função biológica. Nesse caso, a proteína é dita desnaturada (Campese, 2004).

2.2.1 Enzimas

Envolvidas em todos os processos naturais que ocorrem, as enzimas, tipo especial de proteínas produzidas dentro das células dos organismos vivos, servem para auxiliar a digestão, processar nutrientes, produzir energia, dar destino a produtos residuais, rearranjar moléculas e regular uma variedade de outras funções metabólicas. Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA que apresentam atividade catalítica, todas as enzimas são proteínas.

São moléculas orgânicas presentes nas células de organismos vivos, com a função específica de catalisar reações químicas. Elas aumentam a velocidade com a qual as reações atingem o equilíbrio. A enzima dá início ao aumento da velocidade de uma reação química por atuar como catalisador. Um verdadeiro catalisador aumenta a velocidade de reação, mas ele próprio não é modificado durante o processo. Nos estágios intermediários da reação, a enzima liga-se à molécula que está sendo transformada e, à medida que o produto vai sendo liberado, a enzima é regenerada na sua forma original (Said et al., 2002).

A maioria das moléculas biológicas são muito estáveis no ambiente aquoso de pH neutro e temperatura moderada encontrado no interior das células. Muitas reações bioquímicas comuns envolvem eventos químicos que são muito improváveis nas condições do ambiente celular, como a formação transiente de intermediários eletricamente carregados e instáveis ou a colisão de duas ou mais moléculas com a orientação precisa e necessária para que ocorra a reação (Lehninger, 1995)

A característica distintiva de uma reação catalisada por enzimas é que ela ocorre no interior dos limites de uma cavidade, ou fenda, na estrutura molecular da enzima chamada sítio ativo. A molécula que se liga ao sítio ativo e que sofre a ação da enzima é chamada substrato. O complexo enzima-substrato tem papel central na reação enzimática, ele é o ponto de partida para os tratamentos matemáticos que definem o comportamento cinético das reações biocatalisadas e para as descrições teóricas dos mecanismos enzimáticos (Borracini, 2006).

A maior parte das enzimas produzidas industrialmente tem aplicação na produção, conservação e modificação de produtos animais e vegetais (em especial os alimentos), na produção de medicamentos (vitaminas e hormônios) e na produção de derivados de matérias primas animais e vegetais. Em todos os casos de aplicação citados, trata-se fundamentalmente de imitar tecnologicamente o que é feito na natureza, embora em escala condicionada à necessidade e à vontade do homem (Kieling et al., 2002).

Os vegetais são uma fonte limitada de enzimas, uma vez que a quantidade de enzima que pode ser extraída de uma grande massa vegetal é bem pequena; isso se torna economicamente viável apenas onde a mão de obra e a terra têm baixo custo. E mesmo nestas condições, poucas são as enzimas que podem ser obtidas, entre elas, as proteinases: papaína, bromelina e ficina (Sbruzzi, 2010).

2.2.1.1 Proteases

Enzimas proteolíticas, ou proteases, catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas. São enzimas da classe três, as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. Estas enzimas constituem uma grande família (EC 3.4), dividida em endopeptidases ou proteinases (EC 3.4. 21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica.

Estas endopeptidases podem ser ainda subdivididas de acordo com o grupo reativo no sítio ativo envolvido com a catálise em: serina (EC 3.4.21), cisteína (EC 3.4.22), aspártico-proteinases ou endopeptidases (EC 3.4.23) e metaloproteinases ou metaloendopeptidases (EC 3.4.24). As enzimas cujo mecanismo de ação não está completamente elucidado são classificadas no subgrupo EC. 3.4.99.

Proteases representam uma classe de enzimas com importantes papéis em processos fisiológicos. Além disto, elas possuem aplicação comercial, estando entre os três maiores grupos de enzimas industriais, sendo responsáveis por 60% da venda internacional de enzimas. Estas enzimas estão envolvidas em processos biológicos essenciais, como a coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos.

Várias etapas proteolíticas importantes ocorrem no mecanismo invasivo de tumores, assim como no ciclo de infecção de um grande número de vírus e microrganismos patogênicos. Estes fatos tornam as proteases um alvo quimioterápico valioso para o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos. As enzimas proteolíticas também participam no catabolismo de proteínas, tanto nas vias degradativas como nas biossintéticas, e na liberação de hormônios peptídicos farmacologicamente ativos a partir de proteínas precursoras.

Certas modificações específicas e seletivas de proteínas durante a ativação de enzimas ocorrem via proteólise, que também colabora no transporte de proteínas secretórias na membrana. As proteases têm também uma variedade de aplicações principalmente na indústria de detergentes e de alimentos. Tendo em vista os recentes acordos mundiais para uso de tecnologias não poluentes, as proteases começaram a ser usadas em larga escala no tratamento do couro, em substituição aos compostos tóxicos e poluentes até então usados. Na indústria farmacêutica, as proteases são usadas em pomadas cicatrizantes e têm um uso potencial para outros medicamentos. Proteases hidrolisam as proteínas em peptídeos e aminoácidos, facilitando a sua absorção pelas células; devido a seu papel despolimerizante, as enzimas extracelulares têm um papel importante na nutrição.

2.2.1.2 Atividade Enzimática

As medidas de concentração, expressas em unidades de massa por unidades de volume não tem aplicação para soluções enzimáticas, já que o interesse dos processos não é a massa de determinada enzima, mas a sua atividade. Uma Solução de enzimas desnaturadas conserva a massa proteica, mas a propriedade catalítica foi perdida.

As enzimas apresentam a capacidade de reagir com determinados constituintes das células, denominados substratos, formando complexos, ou mesmo compostos com ligação covalente, sendo atribuída a denominação atividade biológica para este evento. Esta atividade, então, vai depender da estrutura das enzimas, isto é, do número de cadeias peptídicas e arranjo dessas cadeias na molécula, da natureza do substrato e ainda, se existir, da natureza do grupo protético.

A determinação da atividade enzimática envolve a medida da velocidade da reação que a enzima catalisa. Dada à especificidade das enzimas, essa medida é possível mesmo na presença de outras proteínas. Para efetuar tais dosagens, uma amostra da solução contendo a enzima é incubada com concentrações altas de substrato (para garantir a velocidade máxima e impedir que pequenas variações na concentração do substrato possam afetar as medidas) (Baumer et al., 2008).

Segundo a *Enzyme Commission*, “uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um μmol de substrato ou a formação de um μmol de produto por minuto”, nas estabelecidas condições do ensaio (temperatura, pH, concentração de substrato).

A atividade específica é o número de unidades de enzima por miligramas de proteína. Assim, se uma etapa de purificação for bem sucedida, a atividade específica encontrada deve aumentar. A atividade específica é expressa em termos de atividade por miligrama de proteína (U/mg).

2.3 Bromelina

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de endopeptidases encontradas no abacaxi (*Ananas Comosus*) e, na verdade, a todas as proteases oriundas dos membros pertencentes à família *Bromeliaceae* (Kennedy et al., 2004). Seguindo esta definição, estas enzimas foram originalmente nomeadas com números sistemáticos IUDMB separados (EC 3.4.4.24 e 3.4.4.25), correspondendo às denominações “bromelina do talo” e “bromelina do fruto”, respectivamente. Posteriormente foram agrupadas sob a denominação EC 3.4.22.4 e separados novamente em 1992. Desde então a nomenclatura IUDMB utilizada é EC 3.4.22.32 e EC 3.4.22.33, para a bromelina do talo e fruto, respectivamente (Kennedy et al., 2004). A bromelina é utilizada em indústrias alimentícias, no processamento de carnes, e utilizada com fins terapêuticos onde tem ação comprovada na inibição da agregação plaquetária (Rowan et al., 1990); atividade fibrinolítica (Morita et al., 1979); ação anti-inflamatória (Harrach et al., 1998); ação antitumoral (Leung et al., 1980); modulação de citocininas e do sistema imune (White et al., 1988); adjuvante na absorção de drogas (Morita et al., 1979); assistência na digestão (De-Giuli et al., 1978; apud Silveira et al.,

2009); adjuvante na cicatrização (Inoue et al., 1994); e aumento na capacidade cardiorrespiratória (Uhlir et al., 1981; apud Silveira et al., 2009).

A forma da bromelina comercialmente encontrada é a bromelina do talo, apesar da grande quantidade de resíduos de abacaxi fruto proveniente das indústrias de conserva de abacaxi (César, 2005).

As bromelinas estão presentes nos primeiros estágios do desenvolvimento dos frutos do *Ananas comosus*, porém seu nível aumenta rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, onde tem um pequeno decréscimo. Este decréscimo na atividade não é acompanhado por mudança correspondente na concentração de proteínas totais (Murachi, 1976)

A bromelina do talo representa quase 90% de todo o material proteolítico presente no extrato do talo do abacaxi e é quimicamente conhecida desde 1876, entretanto, só foi introduzida como composto terapêutico em 1957. Possui sequência de aminoácidos variando de 212 (Kuik et al., 1986; Ritonja et al., 1989) a 315 aminoácidos (Muta et al., 1993), e massa molar variando de aproximadamente 23 kDa (Wharton, 1974; Harrach et al., 1995; Harrach et al., 1998) a 35-37 kDa (Silverstein et al., 1975; Suh et al., 1992). Seu sítio ativo está nos aminoácidos 26 e 158, apresentando três pontes dissulfeto e uma sequência de carboidratos ligados ao aminoácido 117, para a bromelina de 212 aminoácidos (Kuik et al., 1986; Ritonja et al., 1989), já para a enzima de 315 aminoácidos, seu sítio ativo está nos aminoácidos 147 e 279, apresentando também três pontes de dissulfeto, mas nenhuma sequência de carboidratos (Muta et al., 1993).

2.4 Processos de Separação

À medida que a biotecnologia progride do laboratório de pesquisa ao mercado, a necessidade de processos de produção em larga escala torna-se óbvio. Por outro lado, a purificação de proteínas envolve a separação de uma espécie a partir de uma mistura na qual, em sua essência, todos os seus constituintes possuem as mesmas características principais. É necessário, então, explorar plenamente as propriedades nas quais as proteínas diferem uma das outras para elaborar um processo de separação adequado.

O ponto de partida para o planejamento e projeto de um processo de separação deve ser a escala comercial final, onde se espera que a atividade em desenvolvimento reflita a versão reduzida. (Smith, 1968; apud Wheelwright, 1989). Considerando a escala final desde a etapa de planejamento evitar-se-á uma falha comum, que é o uso de operações unitárias onerosas ou difíceis de operar em larga escala (Wheelwright, 1989).

Os processos de biosseparação podem incluir lise celular, centrifugação, cromatografia, secagem, evaporação, extração, separação por membrana e precipitação. Embora muitos processos de purificação estejam em uso, não há um método definido ou previsto que alguém possa seguir para desenhar um protocolo de separação para uma proteína específica ou bioproduto (Wheelwright, 1991).

Downstream process, denominação comumente utilizada para os processos de separação de Bioprodutos, é definido como uma série de etapas que, quando seguida, resulta em uma proteína purificada como produto. Deste modo, os diversos estágios que compõem a purificação de bioprodutos, descritos diferentemente por vários autores, recaem nas categorias de recuperação, purificação de baixa resolução e purificação de alta resolução. Belter et al. (1988) refere-se a estes como quatro passos: remoção de sólidos insolúveis (clarificação); isolamento do produto ou purificação de baixa resolução; purificação de alta resolução; e polimento ou acondicionamento final do produto.

A clarificação é assim denominada, pois a remoção de sólidos suspensos, constituídos, sobretudo por células íntegras e seus fragmentos, resulta na redução da turbidez do meio (Pessoa Jr et al., 2005; apud Silveira et al., 2009). As operações de

purificação de baixa resolução compreendem a separação da molécula-alvo em relação a moléculas com características físico-químicas significativamente diferentes. Já a purificação de alta resolução compreende a separação de classes de moléculas com características físico-químicas semelhantes (Pessoa Jr et al., 2005; apud Silveira et al., 2009).

2.4.1 Precipitação de Proteínas

Uma grande parte dos procedimentos atuais de purificação de proteínas utilizam somente os métodos de precipitação como principal meio de separar uma proteína (ou classe de proteínas) de outra.

A precipitação é uma técnica de purificação comum utilizada pra concentrar proteínas. A precipitação de proteínas, então, é o processo de separação no qual uma proteína é removida de uma solução como um sólido, alterando-se a solubilidade da proteína com a adição de um reagente (Evans et al., 2009).

Existem vários métodos ou sistemas através dos quais se podem conduzir a precipitação. O desafio é determinar qual é o método mais adequado para alcançar os objetivos desejados. A precipitação pode ser induzida pela adição de sais neutros, solventes orgânicos, não iônicos polímeros hidrofílicos, íons metálicos polivalentes, ou por um ácido ou base para induzir uma precipitação no ponto isoelétrico (Harrison, 2003; apud Evans et al., 2009). Os fatores mais importantes que influenciam solubilidade das proteínas são a estrutura, tamanho, carga, e os solventes (Ladisch, 2007; apud Evans et al., 2009).

A proteína precipitada geralmente não é desnaturada e a atividade é recuperada após a ressuspensão do precipitado. Além disso, estes sais podem estabilizar proteínas contra a proteólise desnaturação, ou contaminação bacteriana. A causa da precipitação é diferente daquela para a precipitação isoelétrica e, portanto, os dois são usados em sequência para obter purificação diferencial.

Em muitos casos, é desejável manter a atividade e a estrutura da proteína após a precipitação. Isso pode ser feito através da adição de sais neutros (*salting-out*), ou pela adição de polímeros hidrofílicos não iônicos, como polietileno glicol. Hofmeister (1887,

1890; apud Evans et al., 2009) descreveu pela primeira vez o uso de sais neutros para precipitar proteínas. O sal mais comumente utilizado é o sulfato de amônio, devido a sua alta solubilidade em água e ausência de efeitos adversos sobre a atividade biológica das proteínas.

2.4.1.1 Precipitação Fracionária com Sulfato de Amônio

A solubilidade de uma proteína específica em solução aquosa depende da composição do solvente e do pH, consequentemente, a variação destes parâmetros fornece uma maneira de purificar proteínas por precipitação fracionada. Os fatores que determinam a solubilidade são complexos, pois a superfície de uma proteína é complexa, contendo resíduos ionizados, regiões polares e apolares, as quais irão interagir com o solvente de uma forma que não é completamente compreendida.

Para solubilizar proteínas, a água constituinte das soluções proteicas é forçada a entrar em contato com os grupos hidrofóbicos, predominantes no interior da proteína e em menor frequência localizados na superfície, tornando-os ordenados (figura 1).

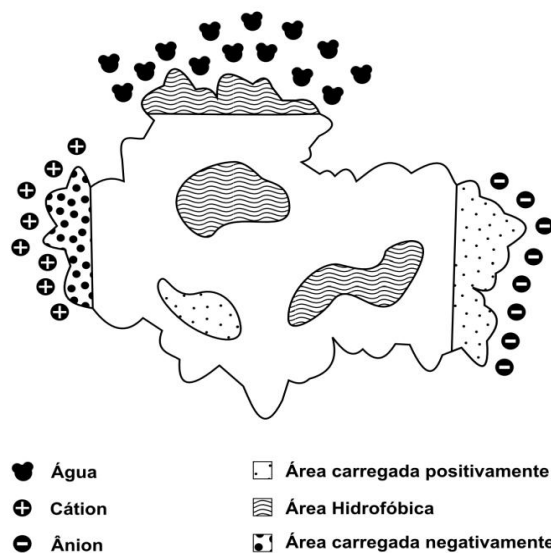


Figura 1 – Solvatação dos grupos hidrofóbicos por moléculas de água.

Quando os sais são adicionados ao sistema, as moléculas de água solvatam os íons de sal e, com o aumento da concentração do mesmo, a água de solvatação das proteínas são removidas. A exposição das regiões hidrofóbicas de uma molécula de proteína possibilita a

ocorrência de interações entre esta e outra, resultando em um aglomerado proteico. Assim, as proteínas com grupos hidrofóbicos mais extensos (ou maior número destes) irão agregar e precipitar antes daquelas com grupos menores, ou em menor número, resultando em um fracionamento (Harris, 2001).

Os agregados formados são uma mistura de várias proteínas e, como na precipitação isoeletrica, a natureza do extrato afetará a concentração de sal necessária para precipitar a proteína de interesse. Em contraste a precipitação isoeletrica, o aumento da temperatura interfere positivamente na quantidade de precipitado. Contudo, o *salting-out* é realizado a 4 °C para diminuir o risco de inativação (por, por exemplo, proteases) (Harris, 2001).

Enquanto vários sais podem ser utilizados como agentes precipitantes, o sulfato de amônio possui várias propriedades que o tornam mais vantajoso. Entre elas, a ótima estabilização da estrutura da proteína, alta solubilidade, baixo custo e pronta disponibilidade do material puro.

A figura 2 mostra uma típica curva de solubilidade de proteínas, onde o logaritmo da solubilidade da proteína é plotado como uma função da concentração de sulfato de amônio.

As principais características desta curva é uma região de baixo teor de sal onde a solubilidade aumenta (chamada *salting-in*), e, em seguida, uma região onde a solubilidade decresce linearmente com o aumento da concentração de sulfato de amônio (chamada *salting-out*). A última parte da curva pode ser descrita pela equação $\log_{10} S = \beta - K_s(\Gamma/2)$, onde S é a solubilidade da proteína em mg/ml de solvente, $\Gamma/2$ é a força iônica, e β e K_s são constantes características da proteína em questão.

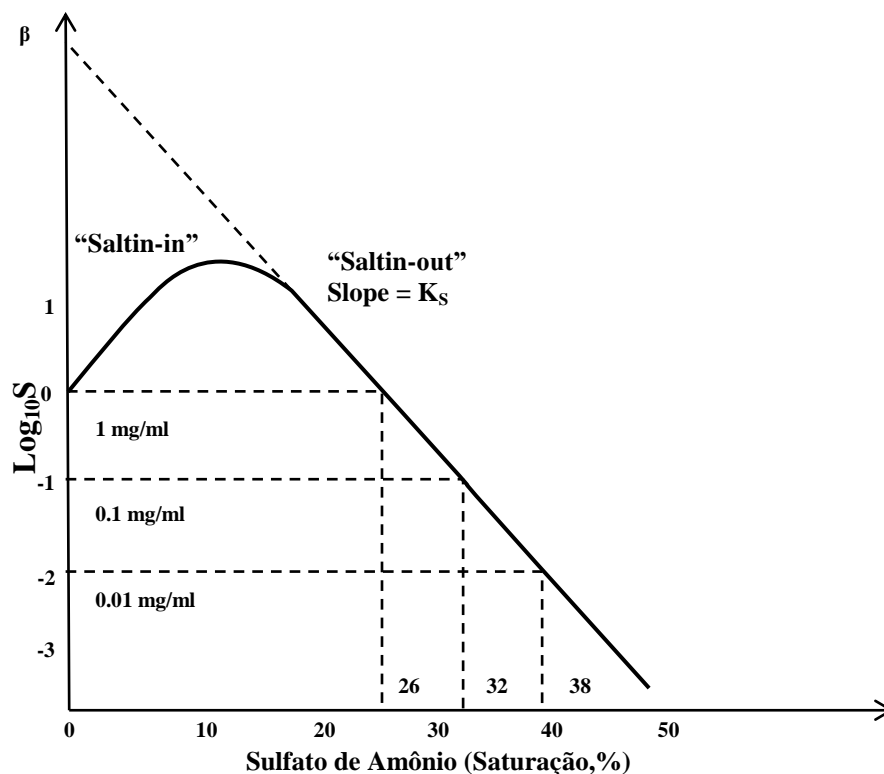


Figura 2 – Curva de Solubilidade do Sulfato de Amônio para uma proteína hipotética (Evans et al., 2009)

Esta curva representa o log da solubilidade de uma proteína hipotética como uma função da saturação percentual de sulfato de amônio. A linha de “*salting-out*” segue a relação $\log S = \beta - K_S(\Gamma/2)$, onde $\Gamma/2$ é a força iônica, que é dada aqui como um percentual de saturação de sulfato de amônio.

Assim, sabe-se que uma proteína precipitará sobre uma faixa de valores de força iônica (determinada pelos valores de K_S) e que diferentes proteínas precipitarão em diferentes, mas frequentemente sobrepostos, intervalos. Isso ressalta o fato de que raramente é possível purificar uma proteína específica de uma mistura complexa utilizando somente a precipitação fracionada.

O mérito da técnica está, então, no simples procedimento para o enriquecimento da proteína de interesse a partir de grandes volumes de extratos e, ao mesmo tempo, em seu potencial para concentrar a fração, com purificações em grande escala em particular, que é importante para reduzir o problema a uma escala “operacionalizável”.

2.4.2 Sistemas Bifásicos Aquosos

O desenvolvimento de processos de purificação de bioprodutos requer que diversos critérios sejam considerados, uma vez que suas aplicações necessitam que a solubilidade, estabilidade e atividade biológica destes compostos sejam mantidas.

A purificação e separação de proteínas baseadas nos princípios de partição em sistemas de duas fases aquosas têm sido alvo de muitos pesquisadores nos últimos anos. Esta técnica de extração parece ser especialmente adequada para as primeiras etapas dos procedimentos de separação, mas pode substituir etapas cromatográficas ou ser aplicada antes da cromatografia (Hustedt et al., 1985)

Os Sistemas bifásicos aquosos formam-se pela adição de soluções aquosas de dois polímeros hidrofílicos, como PEG (polietileno glicol) e dextrana ou de um polímero e um sal, como PEG e fosfato de potássio (Kula, 1979; Albertsson, 1986; apud Harris, 2001). A fase mais leve é rica em polietileno glicol enquanto a fase mais pesada é enriquecida com dextrana ou sais.

A partição ocorre como resultado das incompatibilidades entre propriedades de soluções aquosas dos polímeros, ou de um polímero e um sal de elevada força iônica. Estas espécies constituem um meio conveniente e adequado para a extração de substâncias de origem biológica, pois a constituição das fases, entre 70% e 90% de água, proporciona um ambiente suficientemente ameno, preservando sua estabilidade molecular e permitindo, assim, o seu processamento neste meio (Coimbra, 1995).

A separação espontânea, em fases distintas, devido à adição de soluções aquosas de dois polímeros foi inicialmente observada pelo microbiologista holandês Beijerinck, em 1986, ao misturar ágar com gelatina ou amido solúvel. A fase inferior era rica em ágar e a superior em gelatina (ou amido). Em 1956, Albertsson constatou que sistemas formados por polímeros solúveis e solventes orgânicos também possibilitam a partição de materiais biológicos, ou seja, permitiam que uma terceira substância introduzida no sistema fosse coletada, preferencialmente, numa das fases por ajuste de parâmetros físico-químicos (Ferreira, 2007).

A separação de grupos específicos de proteínas pode ser obtida através da manipulação do coeficiente de partição do sistema bifásico. Tal coeficiente é função da massa molar e presença de grupos hidrofóbicos no polímero, além do tipo e força iônica do íon utilizado (Harris, 2001).

A extração com SBAs oferece certas vantagens para o processamento em larga escala. Algumas delas são: o elevado rendimento, a faixa de trabalho próxima do equilíbrio, a fácil ampliação de escala (*scale-up*) e o uso em processos contínuos. Com isto, o interesse na aplicação de sistemas de duas fases aquosas deixou de se restringir à biologia celular para concentrar-se na análise dos fundamentos da separação de fases e da partição de proteínas, na redução dos custos do processamento, no aumento da seletividade da extração (por exemplo, pela adição de ligantes), na pesquisa de novos componentes formadores das fases, especialmente para substituir a dextrana, que é um componente de elevado custo, e na operação em múltiplos estágios (Coimbra, 1995).

2.4.2.1 Tipos de Sistemas Bifásicos

Existe uma grande variedade de polímeros hidrofílicos, naturais ou sintéticos, capazes de gerar a separação das fases ao se misturarem com um segundo polímero ou um composto de baixa massa molar, como um sal, cujos efeitos de mistura levam a separação das fases.

A escolha dos componentes das fases, utilizados frequentemente por pesquisadores, fornecem coeficientes de partição bastante atraentes, muito embora tenham sido escolhidos ao acaso. Albertsson (1986), subdividiu os sistemas bifásicos aquosos em quatro grandes grupos, mostrados na tabela 1.

Apesar da grande variedade de sistemas bifásicos aquosos, os sistemas realmente aplicáveis para extração de bioprodutos, quando se levam em considerações fatores importantes do ponto de vista industrial (como custo e possibilidade de reciclagem dos reagentes, tempo de separação de fases; possibilidade de esterilização; baixa toxicidade e faixa de aplicação), se reduzem aos formados por PEG/sal (fosfato/citrato/sulfato) e PEG/dextrana. Devido a tais fatores, os estudos mais recentes tendem a concentrar-se mais nesses dois sistemas, sendo o sistema PEG/sal o mais estudado devido ao seu baixo custo e menor tempo de separação de fases em relação ao sistema PEG/dextrana (Coimbra, 1995).

Tabela 1: Tipos de Sistemas Bifásicos.

| Dois Polímeros não iônicos | | |
|--|-------------------------------|--------------------------------|
| Grupo I | PEG | Sulfato de magnésio |
| | | Dextrana |
| | | Polivinil álcool |
| | Ficoll | Dextrana |
| | Metilcelulose | Hidroxipropildextrana |
| | Propileno glicol | Dextrana |
| Polieletrólito / Polímero não iônico | | |
| Grupo II | Sulfato dextrana de sódio | Polipropileno glicol |
| | Carboximetildextrana de sódio | PEG |
| | Carboximetilcelulose de sódio | Metil celulose |
| Dois Polieletrólitos | | |
| Grupo III | Sulfato dextrana de sódio | Carboximetildextrana de sódio |
| | Carboximetildextrana de sódio | Carboximetil celulose de sódio |
| Polímero não iônico / Composto de Baixa Massa Molar | | |
| Grupo IV | Polipropileno glicol | Fosfato de potássio |
| | | Glicose |
| | Metoxipolietileno glicol | Fosfato de potássio |
| | PEG | Fosfato de potássio |
| | | Citrato de Sódio |
| | | Sulfato de Magnésio |

2.4.2.2 Diagrama de Fases

Acima de uma determinada concentração, misturas aquosas de dois polímeros com estruturas distintas dão origem a sistemas bifásicos, onde cada fase está enriquecida com um dos dois polímeros. A esta concentração dá-se a denominação de concentração crítica. Um efeito similar é observado ao se misturar uma solução polimérica com um sal acima da concentração crítica.

Sistemas bifásicos são caracterizados por diagramas de fases (figura 3). A linha curva (curva binodal) separa duas regiões de composições possíveis para a fase do sistema: Composições poliméricas acima da curva binodal fornecem sistemas com duas fases, todas as composições representadas pelos pontos na curva binodal, ou abaixo dela, resultam em uma fase.

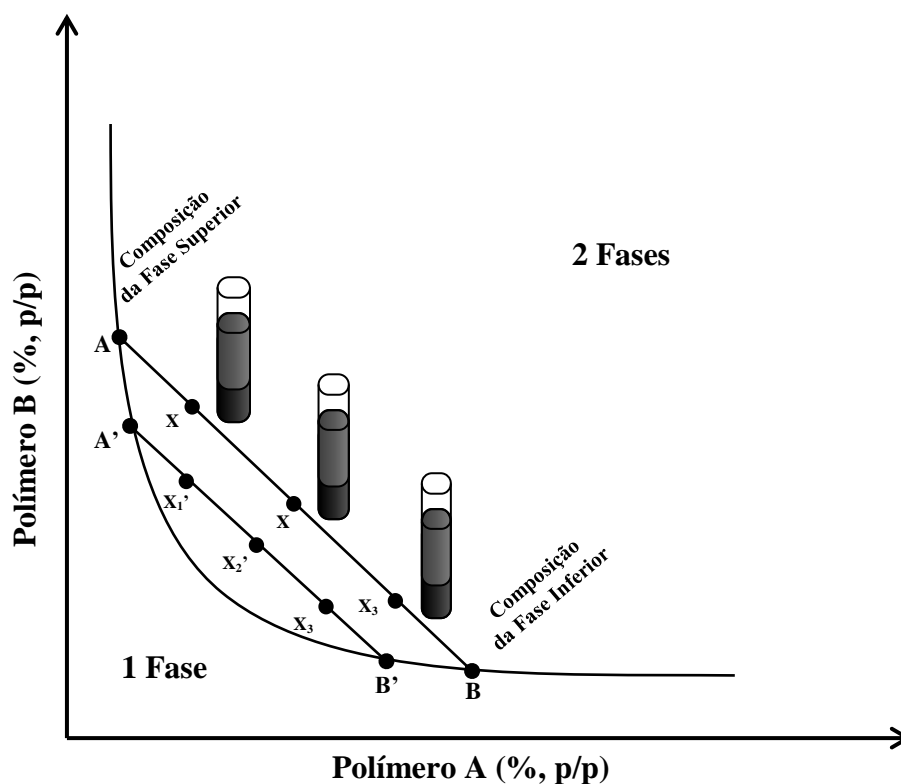


Figura 3 – Diagrama de Fases Esquemático

A composição inicial do sistema é dada pelos pontos x_i' s e as composições finais de cada fase após atingir o equilíbrio são dadas pelos pontos A' (fase superior ou de topo) e B' (fase inferior ou de fundo). Cada ponto nas linhas que conectam a composição de equilíbrio da fase de topo e da fase de fundo representam sistemas bifásicos com a mesma composição polimérica na fase de topo e na fase de fundo, respectivamente, cuja única diferença está nos volumes das fases.

2.4.2.2.1.1 Tempo de Separação das Fases

A obtenção das duas fases se caracteriza pelo turvamento da solução. O tempo necessário para a separação das fases após a mistura dos componentes depende do sistema e varia consideravelmente. Dentre outros fatores, o tempo de separação de fases depende da diferença na densidade entre as duas fases e suas viscosidades. Perto do ponto crítico, a diferença da densidade é pequena, e o tempo de separação é grande. Longe do ponto crítico, a concentração de polímeros e a viscosidade são altas, o que torna o tempo de separação também longo para esses sistemas. Assim, para composições intermediárias, o tempo de separação é menor (Kula, 1979). Em sistemas dextrana/ficoll, o tempo varia de 1 a 6 horas pela ação da gravidade, enquanto em sistemas PEG/dextrana esse valor cai para 5 a 30 minutos dependendo da concentração e da massa molar dos polímeros. Nos sistemas PEG/fosfato, o tempo de separação entre as fases é inferior a 5 minutos (Coimbra, 1995).

A velocidade de coalescência das bolhas que se formam durante a agitação da mistura é um dos fatores que influenciam o tempo de separação. Nesta etapa, cujos principais objetivos são aumentar o contato entre os componentes e uniformizá-lo, ocorre, inicialmente, a formação de pequenas regiões ricas em cada componente. Com o tempo, essas regiões aumentam e separam-se em duas regiões distintas (Bamberger, 1985).

2.4.2.3 Coeficiente de Partição

Para medir a eficiência do processo de separação da substância de interesse, mostrando a sua distribuição entre as fases do sistema, utiliza-se a grandeza K , denominada coeficiente de partição. O coeficiente de partição é definido como a razão entre as concentrações do componente a ser particionado na fase superior e inferior depois de atingido o equilíbrio:

$$K = \frac{[C]_{fs}}{[C]_{fi}} \quad (1)$$

Onde $[C]_{fs}$ é a concentração da substância de interesse na fase superior no equilíbrio e $[C]_{fi}$ é a concentração da substância de interesse na fase inferior no equilíbrio.

Este coeficiente pode ser calculado tanto para a substância de interesse como para os contaminantes ou proteínas totais presentes na amostra, podendo-se comparar estes valores. Qualitativamente, o mecanismo que governa a partição das espécies pode ser entendido como o resultado das interações, de diversos tipos, que ocorrem entre as substâncias de interesse e os componentes do sistema, tais como: interações de cargas, interações entre as pontes de hidrogênio, força de Van der Waals e interações hidrofóbicas. Existindo, portanto, uma série de fatores que certamente influem na eficiência da partição (Albertsson, 1986).

O efeito líquido destas interações possivelmente é diferente nas duas fases e, por consequência, haverá um enriquecimento da fase na qual a transferência seja energeticamente favorável.

A fração de proteína extraída para as fases superior (Y_P^t) e inferior (Y_P^b) pode ser determinada pela seguinte expressão (Harris, 2001):

$$Y_P^t(\%) = \frac{100}{1 + \frac{V_b}{V_t \cdot K_P}} \quad (2)$$

$$Y_P^b(\%) = \frac{100}{1 + K_P \cdot \frac{V_t}{V_b}} \quad (3)$$

Onde V_b e V_t são os volumes da fase inferior e de topo, respectivamente.

Quando relacionado à purificação de proteínas, o coeficiente de partição é representado por K_p , sendo calculado por uma expressão idêntica a supramencionada. Onde os subscritos **t** e **b** referem-se, respectivamente, à fase de topo e fundo.

$$K_P = \frac{C_t}{C_b} \quad (4)$$

De forma análoga, para enzimas (K_A), é expresso pela relação entre a atividade enzimática (S_A^{phase}) encontrada em cada fase, como se pode observar abaixo:

$$K_A = \frac{S_A^t}{S_A^b} \quad (5)$$

Para atingir elevados fatores de recuperação e concentração de uma proteína em SBAs, é necessário maximizar a diferença entre os valores de K da proteína a ser purificada e dos contaminantes.

2.4.2.4 Fatores que Influenciam o Comportamento do Sistema

Dentre os fatores relacionados às alterações das condições dos sistemas bifásicos, cujos efeitos alteram, por conseguinte, o diagrama de fase dos mesmos, pode-se citar os de maior importância, tais como: *Massa Molar do Polímero, Concentração dos Componentes do Sistema, Temperatura.*

Flutuações na massa molar do polímero implicam em diferentes concentrações críticas, ou seja, a utilização de um polímero de maior massa molar, por exemplo, acarretará em uma menor concentração necessária do mesmo para a formação das duas fases. Este evento impelirá, então, um deslocamento da curva binodal na direção da região monofásica e, portanto, ocorrerá à medida que a massa molar aumente.

Observado em sistemas polímero-polímero (PEG/DexMA, por exemplo) este efeito revelaria que a curva binodal se torna progressivamente assimétrica à medida que a diferença entre as massas molares dos polímeros aumenta (figura 4).

A massa molar do polímero alteraria também o tempo de separação das fases, mas tal problema pode ser minimizado pela centrifugação do sistema após a mistura das fases (Albertsson et al., 1994).

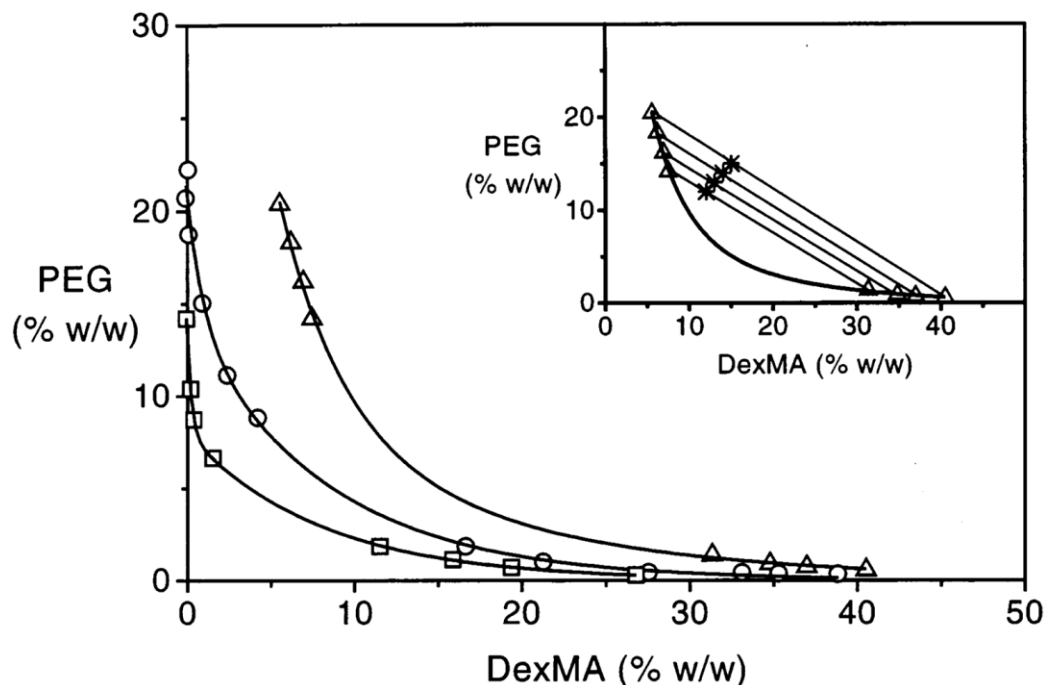


Figura 4 – Diagrama de Fase para o Sistema PEG 10.000 e Dextrana Metacrilada (DexMA) 6.000 (Δ), 40.000 (\circ), 22.000 (\square) (Stenekes et al., 1999).

A figura acima traz ainda o diagrama de fases para o PEG 10.000 e DexMA 6.000 incluindo as linhas de amarração, cuja relação com a concentração dos componentes pode ser observada, e a concentração inicial (*). O incremento na concentração dos componentes do sistema produz, além da inferência no comprimento da linha de amarração, mudanças significativas na viscosidade e densidade do sistema, ocasionando diferenças no tempo de separação das fases e na razão de volumes (César, 2005).

O efeito da temperatura, por sua vez, causa influência no diagrama de fases, pois altera a composição das fases no equilíbrio, deslocando a curva binodal e modificando também o comprimento da linha de amarração. Em geral, o comprimento desta linha diminui com o aumento de temperatura, contudo, seu efeito varia de acordo com o tipo de sistema.

No caso de sistemas PEG/dextrana, a formação das fases é facilitada em temperaturas baixas (menores que a ambiente) e para os sistemas PEG/fosfato, a situação é oposta, pois temperaturas mais altas e próximas do ambiente facilitam a separação entre as fases.

O aumento da temperatura do sistema causa ainda, em um sistema PEG/sal, aumento na concentração de PEG na fase polimérica e redução da sua concentração na fase salina. Esse efeito é uma das razões de se trabalhar com a temperatura do sistema fixa (César, 2005).

Todavia, existem diversas variáveis cujos efeitos, de menor intensidade, podem vir a interferir significativamente no comportamento do diagrama de fases. O pH e o tipo de cátion, por exemplo, tem seus efeitos intensificados em sistemas cujas espécies a serem particionadas são proteínas. Um decréscimo no valor do pH em sistemas polímero/sal, e.g., aumentaria as concentrações críticas do polímero e sal, deslocando a curva binodal para a direita. Para sistemas PEG/Fosfato, este comportamento decorre do aumento da razão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ com a diminuição do pH, uma vez que o ânion dihidrogenofosfato é menos efetivo no efeito de *salting-out* do PEG, requerendo assim uma concentração maior dos componentes para formar o sistema bifásico. No caso do tipo de cátion, a utilização de fosfato de sódio em substituição ao fosfato de potássio deslocaria a curva binodal para a direita e, portanto, a concentração dos componentes necessária para a formação do sistema de duas fases aumenta, sugerindo que o cátion sódio é mais eficiente que o cátion potássio para o efeito do *salting-in* do PEG (César, 2005).

2.4.2.5 Aspectos Econômicos dos SBAs

O grau de pureza exigido para uma proteína depende diretamente da sua finalidade. Proteínas destinadas ao uso terapêutico requerem alto grau de pureza e geralmente demandam maior custo de produção. Exigência que geralmente não se aplica aquelas proteínas destinadas a operações industriais e unitárias.

O custo dos compostos químicos é fator predominante na recuperação em larga escala de proteínas a partir de matriz celular. Deste modo a utilização de componentes de custo reduzido e sua posterior reciclagem são consideradas essenciais para viabilidade do

processo. Isto tem favorecido a escolha de sistemas de PEG/sal no uso industrial. Estes sistemas também apresentam a vantagem que as fases têm uma viscosidade mais baixa, tornando a separação de fase mais rápida.

Os processos de reciclagem de PEG, facilmente integráveis às etapas de produção, mais empregados são a ultrafiltração e a extração com solventes orgânicos, seguida de evaporação (Coimbra, 1995), chegando a níveis de recuperação em torno de 90% (Hustedt et al., 1985).

O descarte de sais é geralmente mais problemático. Em sistemas contendo células, ácido nucléico e proteínas, a separação de sais da fase primária por técnicas de separação mecânica, tais como a centrifugação ou ultrafiltração, é muito difícil de ser conduzida eficientemente. A eletrodíálise é considerada um método geral para reciclagem de sais e para dessalinização da fase rica em PEG (Hustedt et al., 1985).

Adicionalmente, a técnica de extração por SBAs mostrou-se competitiva com outras técnicas como a centrifugação, filtração com tambor e filtração com membranas. Apesar do consumo elevado de reagentes, cerca de 50% do custo total, os custos foram compensados pelo baixo custo observado para o consumo energético e para o investimento em equipamento (Kroner et al., 1992).

Uma análise econômica comparativa realizada entre dois processos de purificação; um utilizando os sistemas de duas fases aquosas e outro constituído essencialmente por precipitação seguida por dois passos cromatográficos. O estudo envolvendo custo de pessoal, material e operação, revelou que uma unidade de atividade enzimática produzida pelo protocolo clássico tinha um custo de cerca de 40 vezes superior ao de uma unidade de enzima resultante das extrações sequenciais em sistemas de duas fases aquosas (Kroner et al., 1992).

2.4.3 Fundamentos da Partição de Proteínas

Os fundamentos de partição de biomoléculas entre duas fases não são totalmente compreendidos, apesar do progresso alcançado com a modelagem termodinâmica da distribuição de proteínas na interface dos sistemas. Devido ao grande interesse industrial no desenvolvimento de tecnologias na área de bioengenharia, também se renovou o interesse pelos processos de separação de proteínas e suas descrições quantitativas que servem de base para a produção em escala industrial.

A partição de proteínas ou outras biomoléculas entre as duas fases é regida pela condição de menor potencial químico ou maior solubilidade, isto é, a biomolécula apresentará maior concentração na fase em que seu potencial químico for menor (Kilikian et al., 2001)

A modelagem quantitativa da partição de proteínas em sistemas de duas fases aquosas representa um complexo problema pelo fato do comportamento do sistema depender de vários fatores, tais quais: tamanho, conformação e estrutura da superfície da molécula da proteína; interações de polímeros com as cadeias de proteínas e com diferentes sais, interações polímero-polímero, sal-proteína, proteína-proteína e, quando usados, interações dos ligantes com os outros componentes presentes. Estudos empíricos com sistemas de duas fases aquosas mostraram que a distribuição da proteína é função de diversos fatores (Baskir et al., 1989; apud Ferreira, 2007), a serem discutidos nos tópicos que se seguem.

Por conseguinte, a seleção das propriedades dos sistemas de duas fases aquosas apropriados para a purificação de uma proteína específica é ainda muito empírica, embora existam regras gerais, relacionadas ao efeito das características do polímero e da composição iônica da proteína, de como a proteína é particionada.

2.4.3.1 Fatores que influenciam a Partição de Proteínas

2.4.3.1.1 Concentração dos Componentes do Sistema

Em sistemas próximos ao ponto crítico geralmente as proteínas apresentam uma partição igual entre as duas fases e, portanto, o valor do coeficiente de partição (K) é igual a 1. Procedendo-se o aumento da concentração dos componentes e consequentemente o aumento no comprimento da linha de amarração, a partição da biomolécula se altera. No entanto, podem ocorrer casos excepcionais de sistemas próximos ao ponto crítico, que apresentem mesmo assim, valores de coeficiente de partição diferentes da unidade. Além de, por outro lado, ocorrerem casos onde o aumento da concentração dos componentes do sistema ocasiona o aumento de K até um valor máximo, decrescendo em seguida.

Para sistemas contendo células ou particulados, o K é maior para concentrações próximas ao ponto crítico. O efeito do comprimento da linha de amarração em K é maior em proteínas com alta massa molar. Além disso, para um sistema PEG/sal, um aumento no comprimento da linha de amarração leva a um aumento da concentração de sal na fase inferior, enquanto que na fase superior permanece praticamente constante. Este comportamento favorece o efeito do *salting-out* da fase rica em sal para a fase rica em PEG (Bamberger, 1985; Albertsson, 1986).

2.4.3.1.2 Massa Molar da Proteína e do Polímero

Em sistemas PEG/sal, a magnitude do fenômeno, de exclusão molecular, que leva a uma partição proteica favorável à fase salina em virtude de uma massa molar elevada do PEG, é diretamente proporcional à massa molar das proteínas presentes.

Sistemas contendo PEG de baixa massa molar deflagram o oposto, a partição será favorável à fase polimérica. O mesmo ocorre nos sistemas PEG/dextrana: caso a massa molar do PEG seja elevada e a da dextrana seja baixa, a partição será favorável à fase contendo dextrana. Isso ocorre devido ao aumento do efeito do volume excluído que ocorre na fase PEG.

Com relação à espécie a ser separada, quanto maior for a superfície da molécula, maior será a área de contato que interage com os componentes do sistema e, de acordo com

as características da mesma e com o tipo de interação, ela será mais favorável a uma das fases. Esse fator é muito importante quando se deseja separar duas substâncias com massas molares muito diferentes (Albertsson, 1986; Yang et al., 1994).

Para proteínas, o coeficiente de partição (K) tem seu valor reduzido com o aumento de sua massa molar, sendo a magnitude do decréscimo maior para polímeros de baixa massa molar e mantendo-se constante para os de alta massa molar (Albertsson, 1986; Forciniti et al., 1991).

Uma vez que as proteínas são macromoléculas polieletrólitas que carregam cargas quando em soluções aquosas, o tipo das mesmas é um dos fatores que influenciam o valor de K . As cargas, portanto, dependem da composição, da sequência de aminoácidos e também das propriedades da solução aquosa, como o pH e a concentração dos solutos.

2.4.3.1.3 Interações entre a Proteína e os Componentes do Sistema

A solubilidade de uma proteína é determinada por interações entre os grupos funcionais compreendidos em sua superfície e o solvente que constitui o meio onde a mesma está presente. A solubilidade dependerá, portanto, da existência de regiões hidrofóbicas e/ou hidrofílicas, tal qual de agrupamentos carregados positiva e negativamente, e da distribuição destes na proteína. Deste modo, fatores termodinâmicos contribuirão ao favorecimento, ou resistência, à solubilização da mesma no solvente. O aumento da proporção de zonas hidrófobas na superfície da proteína resulta no aumento da afinidade a solventes apolares, como é o caso do PEG, fazendo com que se concentre na fase superior.

A solubilidade das proteínas nas soluções de PEG depende da interação hidrofóbica entre a proteína e o agrupamento etileno do mesmo. Isso pode explicar a alta tendência das proteínas hidrófobas deslocarem-se para a fase superior rica em PEG. Nesse caso, o PEG tende a interagir fortemente com as regiões apolares da proteína (Schmidt et al., 1996).

2.4.3.1.4 Hidrofobicidade do Polímero

Ordenando as soluções dos principais polímeros utilizados em SBAs em uma escala de hidrofobicidade, obtemos uma vasta lista de possibilidades de sistemas formados pela combinação desses solventes. Isto significa que, como essas soluções são constituídas basicamente de água, as fases dos sistemas formados serão seletivas para separar espécies cujas posições na escala de hidrofobicidade estejam próximas a do polímero que as constitui.

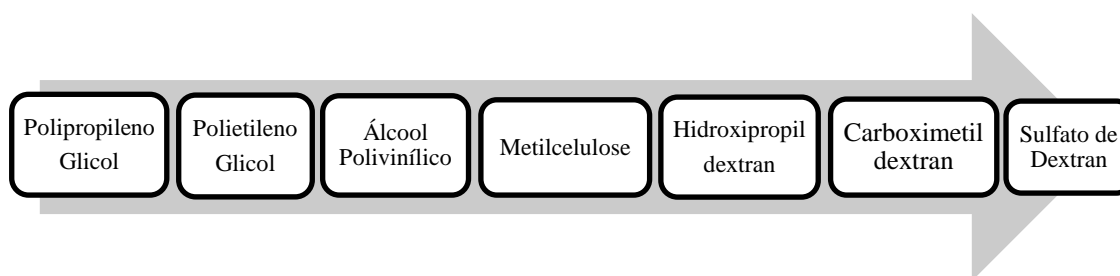


Figura 5 – Escala de hidrofobicidade dos principais polímeros utilizados em SBAs (Albertsson, 1986).

Sistemas PEG/Hidroxipropildextrano são utilizados comumente em estudos cuja diferença de hidrofobicidade entre os componentes é o objeto de análise. Deste modo, o emprego de hidroxipropildextranos de diferentes graus de substituição (números de grupos hidroxipropil), mas com a massa molar da mesma ordem de grandeza, revelou que o PEG forma duas fases com dextran ou com hidroxipropildextrano com o menor grau de substituição, mas não com aqueles com maior número de agrupamentos hidroxipropil. Assim, quanto maior o número de grupos hidrofóbicos na estrutura do dextran, mais compatível será o polímero com o PEG. Usualmente pode-se correlacionar a diferença na hidrofobicidade entre dois polímeros com suas tendências para separação das fases, ou seja, quanto maior a diferença de hidrofobicidade entre dois polímeros, menor a concentração de polímeros necessária para a separação das fases (Albertsson, 1986).

2.4.3.1.5 pH do Sistema

Em virtude da existência de diferentes grupos funcionais ionizáveis nas cadeias laterais de uma proteína, alterações de pH causam mudanças no estado de ionização destes grupos e, portanto, alteram as suas estruturas terciária e quaternária.

Trabalhando-se em um valor de pH próximo ao ponto isoelétrico (pI), onde a somatória de cargas da proteína é praticamente nula, existirá apenas o efeito do tamanho e concentração do polímero e do tamanho e composição da superfície da proteína, considerando-se apenas os efeitos eletrostáticos (Forciniti et al., 1991).

2.4.3.1.6 Concentração de Proteínas

A presença de PEG em SBAs cujas concentrações de proteínas ultrapassam a concentração de $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ não é adequada à determinação apropriada de valores para K , pois sob essas condições, o PEG pode provocar a precipitação da proteína (Schmidt et al., 1996). Ademais, a concentração de proteínas é igualmente importante em sistemas próximos do ponto crítico, pois a adição de uma pequena quantidade de proteína sob estas condições poderá modificar o diagrama de fases, deslocando a curva binodal, como ocorre quando adicionamos uma pequena quantidade de água.

Quando o sistema está afastado do ponto crítico, o deslocamento da curva binodal como consequência de um pequeno incremento na concentração de proteína não ocorrerá, pois a composição das fases praticamente não se modifica com a adição da mesma. Porém, para grandes incrementos poderá ocorrer interferência na formação das fases, provocando a redistribuição dos componentes do sistema, modificando o diagrama de fases e, consequentemente, o valor de K (Guan et al., 1994).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os reagentes empregados no presente trabalho – etapa de clarificação, precipitação e purificação através dos SBAs, além dos ensaios –, bem como os equipamentos utilizados encontram-se citados na tabela 2, incluindo a procedência e grau de pureza, quando aplicável, dos mesmos.

Tabela 2: Equipamentos e Reagentes Utilizados no Trabalho

| | Nome | Marca | Grau de Pureza |
|---------------------|---------------------------------------|--------------|-----------------------|
| Reagentes | Ácido Fosfórico | Synth | 85% |
| | Azocaseína | Sigma | - |
| | Bromelain | Sigma | - |
| | Coomassie Brilliant Blue G-250 | VETEC | - |
| | Fosfato de Potássio Monobásico Anidro | Synth | 99% |
| | PEG 2000 | Sigma | P.A |
| | PEG 4000 | Sigma | P.A |
| | PEG 6000 | Sigma | P.A |
| | Sulfato de Amônio | Synth | 99% |
| | Tricloroacético | Synth | P.A |
| | | | |
| | Descrição | Marca | |
| Equipamentos | Agitador Vortex IA-MS 3 | IKA | |
| | Balança Analítica | MARTE | |
| | Banho Maria Ultratermostato/Criostato | Nova Ética | |
| | Centrífuga Refrigerada Z252MK | HERMLE | |
| | Espectrofotômetro BEL1105 | Photonics | |
| | Estufa | FANEM | |
| | pHmetro | Adamo | |

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção do Extrato Enzimático

O extrato enzimático será obtido a partir da casca, talo e folhas do abacaxi (*Ananas comosus*). Estes resíduos serão coletados em supermercados locais, onde são produzidos diariamente como consequência da comercialização do fruto minimamente processado. O material recolhido será então triturado em processador de alimentos à temperatura ambiente (25 ± 3) °C, duplamente filtrado em tela de nylon, para retirada de fibras e particulados em suspensão, e posteriormente centrifugados a 5000x G por 20 minutos a 4 °C para remoção do material insolúvel. O sobrenadante, doravante denominado *extrato bruto*, seguia então para a realização dos ensaios ou era acondicionado à -5 °C.

3.2.2 Determinação de Proteínas

A determinação de proteínas totais será realizada pelo método descrito por Bradford (1976), cuja técnica para a determinação de proteínas totais envolve a ligação entre proteínas e o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250*.

Este método é baseado na interação entre o corante G-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante G-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente na faixa entre 365 e 595 nm, com máximo em 595 nm.

Este ensaio é bastante reprodutível e rápido. A reação de ligação com o corante completa-se em aproximadamente dois minutos e tem boa estabilidade da cor por uma hora. Além disso, existe pouca ou nenhuma interferência de cátions (como sódio ou potássio) ou carboidratos, como a sacarose.

3.2.3 Determinação de Atividade Enzimática (A^{phase})

A atividade enzimática foi avaliada através do método colorimétrico descrito por Charney et al. (1947). Neste método, há a formação de componentes corados, solúveis em tricloroacético (TCA), como resultado da digestão de proteínas que possuem radicais arilaminas diazotados (azoproteínas). A intensidade da cor no TCA filtrado do substrato digerido é função da atividade proteolítica da solução enzimática e serve como base para o método.

Para o preparo do substrato, azocaseína 1.0% (m/v, Sigma) foi solubilizada em etanol 4% (v/v) e tampão fosfato 100 mM, pH 7,0. O ensaio é iniciado pela adição de 125µL da amostra de extrato enzimático a 125µL do substrato. Esta mistura é homogeneizada rapidamente em agitador vórtex e incubada por 10 minutos a 37 °C.

A reação foi interrompida pela adição de 750µL de TCA 5% (m/v, Synth), seguida pela agitação vigorosa do tubo reacional, promovendo assim a precipitação da azocaseína não digerida em solução. A suspensão foi, então, centrifugada a 4.000x G por 10 minutos.

A absorbância da solução sobrenadante é lida a 440 nm. O branco reacional foi preparado pela adição do TCA ao substrato imediatamente antes da adição do extrato enzimático.

3.2.4 Equações de Rendimento (Y_i^{phase})

O percentual proteico, remanescente na fase líquida, extraído para as fases superior (Y_p^t) e inferior (Y_p^b) é determinado pelas equações abaixo:

$$Y_p^t(\%) = \frac{100}{1 + \left(\frac{1}{K_P} \frac{V_b}{V_t} \right)} \quad (6)$$

e

$$Y_p^b(\%) = \frac{100}{1 + \left(K_P \frac{V_t}{V_b} \right)} \quad (7)$$

Nas quais V_T e V_B são os volumes das fases superior e inferior, respectivamente. O percentual da molécula-alvo retido em cada uma das fases é função de seu volume, conteúdo proteico e atividade específica. Assim, para as fases superior (Y_E^t) e inferior (Y_E^b), tem-se:

$$Y_E^t(\%) = \frac{100}{1 + \frac{K_P \cdot V_t}{K_A \cdot V_b}} \quad (8)$$

e

$$Y_E^b(\%) = \frac{100}{1 + \frac{K_A \cdot V_b}{K_P \cdot V_t}} \quad (9)$$

3.2.5 Fator de Purificação (P_F)

O fator de purificação expressa a pureza relativa de uma fração quando comparada ao extrato que a originou. Sendo assim, é definido pela razão entre a atividade específica da fase purificada em análise e do extrato que a originou.

$$P_F = \frac{S_A^{phase}}{S_A^{extract}} \quad (10)$$

3.2.6 Precipitação Fracionada com Sulfato de Amônio

A Precipitação foi realizada pelo método descrito por (Englard et al., 1990), onde $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ sólido foi adicionado ao extrato bruto, resfriado a 0 °C, até que a saturação desejada (20%, 40%, 60%, 80% e 100%) fosse alcançada. Após cada etapa, a solução era centrifugada a 2000x G por 20 minutos a 4 °C. O pellet resultante foi ressuspensionado em tampão fosfato pH 7.0 200 mM.

A concentração de sal é usualmente expressa em termos do percentual de saturação em determinada temperatura; O anexo I apresenta uma tabela com as quantidades de sulfato de amônio sólido necessárias para obter a concentração desejada a 0 °C (Dawson et al., 1987; Englard et al., 1990).

3.2.7 Planejamento Experimental

Para o planejamento dos experimentos envolvendo o estudo dos sistemas bifásicos aquosos, os fatores escolhidos foram: massa molecular do PEG, concentração de PEG e concentração de sal. O fator de purificação e o rendimento da bromelina foram escolhidos como variáveis de saída (respostas).

Uma vez que faz parte do escopo deste trabalho determinar a influência dos fatores escolhidos no processo e as melhores condições do mesmo com um mínimo de experimentos, delineou-se um planejamento fatorial completo com dois níveis (2^3) com três pontos centrais (Barros Neto et al., 2010).

Os níveis escolhidos, bem como a lista das combinações possíveis entre os mesmos (denominada matriz de planejamento), são apresentados na tabela 3. A faixa de valores escolhida para os níveis da concentração de sulfato de amônio se basearam nos estudos prévios de precipitação fracionária da bromelina utilizando o sal supracitado. Os demais fatores tiveram seus níveis escolhidos baseados em estudos para outros sistemas similares (PEG/Sal) (Ferreira, 2007; Sbruzzi, 2010). A codificação das variáveis, apresentada juntamente com a matriz de planejamento, não tem qualquer significado físico, mas é realizada como uma padronização de variáveis, necessária aos algoritmos utilizados pelos modelos estatísticos no cálculo dos efeitos.

Tabela 3: Matriz de Planejamento Fatorial 2³ realizado para estudar o efeito dos fatores escolhidos sobre o fator de purificação do processo.

| Ensaio | Variáveis Reais | | | Variáveis Codificadas | | |
|--------|-----------------|--|-------|-----------------------|-------|--|
| | MMPEG | [(NH ₄) ₂ SO ₄] | [PEG] | MMPEG | [PEG] | [(NH ₄) ₂ SO ₄] |
| 1 | 2000 | 15,0% | 15,0% | -1 | -1 | -1 |
| 2 | 6000 | 15,0% | 15,0% | 1 | -1 | -1 |
| 3 | 2000 | 15,0% | 25,0% | -1 | 1 | -1 |
| 4 | 6000 | 15,0% | 25,0% | 1 | 1 | -1 |
| 5 | 2000 | 20,0% | 15,0% | -1 | -1 | 1 |
| 6 | 6000 | 20,0% | 15,0% | 1 | -1 | 1 |
| 7 | 2000 | 20,0% | 25,0% | -1 | 1 | 1 |
| 8 | 6000 | 20,0% | 25,0% | 1 | 1 | 1 |
| 9 | 4000 | 17,5% | 20,0% | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 4000 | 17,5% | 20,0% | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 4000 | 17,5% | 20,0% | 0 | 0 | 0 |

Concentrações percentuais dadas em m/m, para o PEG, e em percentual de saturação para o (NH₄)₂SO₄.

O estudo do processo foi realizado utilizando a metodologia de superfície de resposta (ou RSM, de *Response Surface Methodology*), que consiste na otimização, baseada no planejamento fatorial do experimento, dos fatores escolhidos. Esta metodologia possui duas etapas distintas – modelagem e deslocamento –, que são repetidas quantas vezes forem necessárias, com o objetivo de atingir a região ótima da superfície estudada (Barros Neto et al., 2010). A modelagem é feita ajustando-se modelos simples (lineares ou quadráticos) às respostas obtidas com planejamentos fatoriais comuns ou ampliados. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada.

Assim, após a realização do primeiro planejamento é necessário ampliar, e deslocar, a região de estudo. Deste modo, como o número de parâmetros necessários para se construir um modelo quadrático, e localizar o ponto ótimo, envolve um número de parâmetros superior ao obtido, delineou-se um planejamento composto central esférico ($\alpha = \sqrt{2}$), de modo a adequar os níveis à região de melhor resposta. Nesta etapa, no entanto, desenvolver-se-á os experimentos apenas com dois fatores, eliminando-se a massa molecular do PEG deste grupo de variáveis. A eliminação ocorrerá tendo por objetivo avaliar apenas a influência da concentração dos componentes do sistema. O nível (para a variável MMPEG) escolhido para os estudos posteriores será aquele que apresentar melhores resultados para a variável resposta.

Tabela 4: Matrix de Planejamento Fatorial Composto Central Esférico (2²) com triplicata no ponto central.

| Ensaio | Variáveis Codificadas | |
|-----------|-----------------------|---------|
| | PEG | Sulfato |
| 1 | -1 | -1 |
| 2 | 1 | -1 |
| 3 | -1 | 1 |
| 4 | 1 | 1 |
| 5 | 0 | -1,414 |
| 6 | 0 | 1,414 |
| 7 | -1,414 | 0 |
| 8 | 1,414 | 0 |
| 9 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0 |

3.2.8 Preparo dos Sistemas Bifásicos Aquosos

Os sistemas bifásicos foram preparados pela mistura de PEG (com massa molecular de 2000, 4000 ou 6000), sulfato de amônio e tampão fosfato pH 7 200mM. Os sistemas possuíam uma massa total de cinco gramas, cada.

A fração de extrato bruto, contendo a enzima de interesse, adicionada ao sistema foi de 20%. As concentrações de PEG e sulfato de amônio nos sistemas em estudo foram aquelas dadas no tópico 3.2.7, referente ao planejamento experimental utilizado neste trabalho, de modo que os mesmos foram pesados e adicionados ao sistema em sua forma original, sólida. A massa de tampão requerida era calculada pela subtração da massa total do sistema (cinco gramas) pelo somatório das massas dos demais componentes (PEG, sulfato de amônio e extrato).

Após o preparo, os sistemas foram agitados em vórtex por 180 segundos, centrifugados a 5 °C e 3000x G por 10 minutos para acelerar a formação das fases e tiveram alíquotas retiradas de ambas as fases (superior e inferior) para realização das análises. Um diagrama esquemático contendo este procedimento pode ser observado na figura 6.

Preparo dos Sistemas Bifásicos Aquosos

Extrato Bruto

Com base na massa total estabelecida para o sistema (5 gramas), calcula-se a massa de sulfato de amônio e PEG que deve ser adicionada.

A massa de tampão fosfato (pH 7, 200 mM) necessária é calculada subtraindo-se da massa total do sistema a massa acumulada pela adição dos demais componentes (PEG, sulfato de amônio e extrato bruto).

Agitação da mistura em vortex por 180s

Centrifuga-se o sistema a 5°C e 3000xG por 10 minutos para acelerar a formação das fases.

O Volume de Extrato Bruto corresponde a 20% da massa total do sistema (1 grama).

● Extrato Bruto ▲ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
● Bromelina ▲ PEG

Figura 6: Diagrama Esquemático do Procedimento para Preparo dos Sistemas Bifásicos Aquosos

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P. A. **Partition of Cell Particles and Macromolecules**. 3. New York - NY: Wiley & Sons, 1986.

ALBERTSSON, P. A.; TJERNELD, F. Phase diagrams. In: WALTER, H. e JOHANSSON, G. (Ed.). **Methods in enzymology: Aqueous Two Phase System**. New York: Academic Press, v.228, 1994. p.3-13.

BALLS, A. K.; THOMPSON, R. R.; KIES, M. W. Bromelin. Properties and Commercial Production. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 33, n. 7, p. 950-953, 1941. ISSN 0019-7866.

BAMBERGER, S. B., D.E.; SHARP, K.A.; VAN ALSTINE, J.M.; WEBWE, T.J. Preparation of phase system and measurement of their 87 physicochemical properties. In: BROOKS, D. E. W., H.; FISHER, D. (Ed.). **partitionning in aqueous two phase systems**. Orlando: Academic Press, 1985.

BARROS NETO, B. D.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, E. **Como Fazer Experimentos - Aplicações na Ciência e na Indústria**. 4th. Bookman, 2010. 414 ISBN 9788577806522.

BASKIR, J. N.; HATTON, T. A.; SUTER, U. W. Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, n. 4, p. 541-558, 1989. ISSN 1097-0290.

BAUMER, J. D.; DIEGO, S. M. M.; FURIGO JR, A. **Enzimas**. Florianópolis, SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2008. 23.

BELTER, P. A.; CUSSLEY, E. L.; HU, W. S. **Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology**. 1. New York: John Wiley & Sons - Interscience, 1988. 385 ISBN 978-0471847373.

BORRACINI, H. M. P. **Estudo do processo de extração da bromelina por micelas reversas em sistema de descontinuo**. 2006. 84 Dissertação de Mestrado Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697.

CAMPESE, G. M. **Extração e recuperação da bromelina em sistemas de duas fases aquosas PEG4000-POLICAJU**. 2004. 101 Dissertação de Mestrado Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP.

CÉSAR, A. C. W. **Análise de viabilidade econômica de um processo de extração e purificação da bromelina do abacaxi**. 2005. 111 Tese de Doutorado Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A Colorimetric Method For The Determination Of The Proteolytic Activity Of Duodenal Juice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 171, p. 501-505, 1947.

COIMBRA, J. S. R. **Desempenho de um extrator tipo Graesser na separação de proteínas por soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos**. 1995. Tese de Doutorado Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas.

CUSSLER, E. L. **Diffusion: mass transfer in fluid systems**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987.

DAWSON, R. M. C.; ELLIOTT, D. C.; H., E. W.; JONES, K. M. **Data for Biochemical Research**. Third. Oxford: Oxford Science Publications, 1987. 97-97 ISBN 0-19-855358-7.

DE-GIULI, M.; PIROTTA, F. Bromelain: interaction with some protease inhibitors and rabbit specific antiserum. **Drugs Exp Clin Res**, v. 4, p. 21-23, 1978.

DOONAN, S.; CUTLER, P. General Strategies. In: CUTLER, P. (Ed.). **Protein Purification Protocols**: Humana Press, v.244, 2004. p.1-13. (Methods in Molecular Biology™). ISBN 978-1-59259-655-3.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques. . In: (Ed.). **Guide to protein purification**. San Diego, USA.: Academic Press - Deutscher, 1990.

EVANS, D. R. H.; ROMERO, J. K.; WESTOBY, M. Guide to Protein Purification: Concentration of Protein and Removes of Solutes. In: BURGESS, R. R. e DEUTCHER, M. P. (Ed.). **Methods in Enzymology**. London: UK: Elsevier, v.463, 2009. cap. 116-120, p.854. ISBN 978-0-12-374536-1.

FAO. **Medium-term Prospects for Agricultural Commodities: Projections to the Year 2010**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, p.89. 2003

FERREIRA, J. F. **Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato**. 2007. 97 Dissertação de Mestrado Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FORCINITI, D.; HALL, C. K.; KULA, M. R. Protein partitioning at the isoelectric point: Influence of polymer molecular weight and concentration and protein size. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, n. 9, p. 986-994, 1991. ISSN 1097-0290.

GIACOMELLI, E. J.; PY, C. **O Abacaxi no Brasil**. Campinas: Fundacao Cargill, 1981. 109.

GIVNISH, T. J. et al. Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation. **Systematic Biology**, v. 54, n. 2, p. 340-344, 1 de Abril, 2005 2000. ISSN 0-521-43031-3.

GODOI, P. H. D. **Estudo da atividade enzimática da bromelina pura em solução em diferentes temperaturas e pH**. 2007. 62 Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP.

GRANADA, G. G.; ZAMBLIAZI, R. C.; MENDONÇA, C. R. B. **Abacaxi: Produção, Mercado E Subprodutos**: Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos 2005.

GUAN, Y.; TREFFRY, T. E.; LILLEY, T. H. Application of a statistical geometrical theory to aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography A**, v. 668, n. 1, p. 31-45, 1994. ISSN 0021-9673.

HARRACH, T. et al. Isolation and Characterization of Two Forms of an Acidic Bromelain Stem Proteinase. **Journal of Protein Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 351-361, 1998. ISSN 0277-8033.

HARRACH, T. et al. Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem bromelain. **Journal of Protein Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 41-52, 1995. ISSN 0277-8033.

HARRIS, E. L. V. Concentration of Crude Extract. In: ROE, S. D. (Ed.). **Protein Purification Techniques**. 2. Oxford: New York: Oxford University Press, 2001. p.111-154.

HARRISON, R. G. **Bioseparations Science and Engineering**. New York, NY: Oxford University Press, 2003.

HOFMEISTER, F. Zur Lehre von der Wirkung der Sake. **Arch. Exp. Path. Pharm**, v. 24, n. 247, 1887.

HOFMEISTER, F. Über die Darstellung von krystallisirtem Eiralbumin und die Krystallisirbarkeit colloider Stoffe. **Z. Physiol. Chem**, v. 14, n. 165, 1890.

HUSTEDT, H.; KRONER, K. H.; MENGE, U.; KULA, M. R. Protein recovery using two-phase systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 6, p. 139-144, 1985. ISSN 0167-7799.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Rio de Janeiro, p.93. 2011. (0103-443)

INOUE, K. et al. Effect of etodolac on prostaglandin E2 biosynthesis, active oxygen generation and bradykinin formation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 51, n. 6, p. 457-462, 1994. ISSN 0952-3278.

KENNEDY, J.; TURAN, N. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 2. Academic Press, 2004. 2368 ISBN 978-0-12-079610-6.

KIELING, D. D.; FURIGO JR, A. **Enzimas: Aspectos Gerais**. Florianópolis, SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2002. 13.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA JR, A. Purificação de produtos biotecnológicos. In: SCHMIDELL, W., *et al* (Ed.). **Biotecnologia industrial. Volume II. Engenharia Bioquímica**. 1. São Paulo: Biotecnologia industrial. Volume II. Engenharia Bioquímica, 2001.

KRONER, K. H.; HUSTEDT, H.; KULA, M. R. Extractive enzyme recovery: economic considerations. **Proc. Biochem. Eng.**, v. 24, p. 73-118, 1992.

KUIK, J. A. V. et al. **A 500-MHz 1H-NMR study on the N-linked carbohydrate chain of bromelain. 1H-NMR Structural-reporter-groups of fucose a(1-3)-linked to asparagine-bound N-acetylglucosamine**: Wallin and Dalholm 1986.

KULA, M. R. Extraction and purification of enzymes using aqueous two-phase systems. **Applied Biochemistry and Bioengineering**, v. 2, p. 71-95, 1979.

LADISCH, M. **Bioseparations Engineering: Principles, Practice, and Economics**. Principles, Practice, and Economics. John Wiley & Sons Inc, 2007.

LAROCCA, M.; ROSSANO, R.; SANTAMARIA, M.; RICCIO, P. Analysis of pineapple [Ananas comosus (L.) Merr.] fruit proteinases by 2-D zymography and direct identification of the major zymographic spots by mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1334-1342, 2010. ISSN 0308-8146.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. 2. São Paulo: Sarvier, 1995. 1008 ISBN 8573781661.

LEUNG, A. Y.; FOSTER, S. S. **Encyclopedeia of Common Natural Ingredients Used in Foods, Drugs, and Cosmetics**. New York, NY: John Wiley & Sons, 1980. 880.

MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. H.; LAVERDE JR., A. Metabólitos secundários da família bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, p. 1885-1897, 2009. ISSN 0100-4042.

MORITA, A. H. et al. Chromatographic fractionation and characterization of the active platelet aggregation inhibitory factor from bromelain. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 239, n. 2, p. 340-50, 1979. ISSN 0301-4533.

MURACHI, T. [39] Bromelain enzymes. In: LASZLO, L. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. Volume 45, 1976. p.475-485. ISBN 0076-6879.

MUTA, E. et al. Cloning and sequencing of fruit bromelain. 1993.

PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biológicos**. Barueri - SP: Manole, 2005.

RITONJA, A. et al. Stem bromelain: Amino acid sequence and implications for weak binding of cystatin. **FEBS Letters**, v. 247, n. 2, p. 419-424, 1989. ISSN 0014-5793.

ROWAN, A. D.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. **Biochem J**, v. 266, n. 3, p. 869-75, Mar 15 1990. ISSN 0264-6021.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de Interesse Industrial e Biotecnológico**. 2. Rio de Janeiro, RJ: Legis Summa, 2002.

SBRUZZI, D. **Análise da Viabilidade Econômica da Purificação da Bromelina das Folhas de Curauá em Sistema Bifásico Aquoso Peg/Fosfato**. 2010. 115 Dissertação de Mestrado Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP.

SCHMIDT, A. S.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Correlations for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: Effect of overall protein concentration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, n. 6, p. 617-626, 1996. ISSN 1097-0290.

SILVEIRA, E. et al. Expanded bed adsorption of bromelain (E.C. 3.4.22.33) from Ananas comosus crude extract. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 26, p. 149-157, 2009. ISSN 0104-6632.

SILVERSTEIN, R. M.; KEZDY, F. J. Characterization of the pineapple stem proteases (Bromelains). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 167, n. 2, p. 678-686, 1975. ISSN 0003-9861.

SMITH, J. M. "Scale-down to research". **Chemical Engineering Progress**, v. 64, n. 8, p. 78-82, 1968.

SRIWATANAPONGSE, A.; BALABAN, M.; TEIXEIRA, A. **Thermal inactivation kinetics of bromelain in pineapple juice**. St. Joseph, MI, ETATS-UNIS: American Society of Agricultural Engineers, 2000.

STENEKES, R. J. H. et al. The use of aqueous PEG/dextran phase separation for the preparation of dextran microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 183, n. 1, p. 29-32, 1999. ISSN 0378-5173.

SUH, H. J.; LEE, H.; CHO, H. Y.; YANG, H. C. Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple. **J. Koren Agriculture Chemical Society**, v. 35, n. 4, p. 300-307, 1992.

UHLIG, G.; SEIFERT, J. [The effect of proteolytic enzymes (traumanase) on posttraumatic edema]. **Fortschr Med**, v. 99, n. 15, p. 554-6, 1981. ISSN 00158178.

WHARTON, C. W. The structure and mechanism of stem bromelain. Evaluation of the homogeneity of purified stem bromelain, determination of the molecular weight and kinetic analysis of the bromelain-catalysed hydrolysis of N-benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-serine methyl ester. **Biochem. J.**, v. 143, n. 3, p. 575-0, Dec , 1974 1974.

WHEELWRIGHT, S. M. The design of downstream processes for large-scale protein purification. **Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 2-3, p. 89-102, 1989. ISSN 0168-1656.

WHEELWRIGHT, S. M. **Protein Purification: Design and Scale up of Downstream Processing**. Munich: Hanser Publishers - Wiley Interscience, 1991. 227 ISBN 0-471-03723-0.

WHITE, R. R.; CRAWLEY, F. E. H.; VELLINI, M.; ROVATI, L. A. Bioavailability of bromelain after oral administration to rats. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 9, n. 4, p. 397-403, 1988. ISSN 1099-081X.

YANG, W.-Y.; LIN, C.-D.; CHU, I. M.; LEE, C.-J. Extraction of cephalosporin C from whole broth and separation of desacetyl cephalosporin C by aqueous two-phase partition. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, n. 6, p. 439-445, 1994. ISSN 1097-0290.

5 MANUSCRITOS

5.1 Manuscrito apresentado na *The Tenth International Conference Of Chemical & Process Engineering* (ICheaP-10) – **Studies on Bromelain Precipitation by Ethanol, Poly(Ethylene Glycol) and Ammonium Sulphate.**

5.2 Manuscrito apresentado no *XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos* (SINAFERM 2011) – **Purificação de Bromelina dos Resíduos de Abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) por Sistemas Bifásicos Aquosos PEG/Sal.**

5.3 Manuscrito a ser submetido ao periódico *Bioresource Technology* - **Study of bromelain purification by unconventional Aqueous Two-Phase System (PEG/Ammonium Sulphate).**

5.1 Studies on Bromelain Precipitation by Ethanol, Poly(Ethylene Glycol) and Ammonium Sulphate

Paulo Soares^{1,4}, Diego Coelho², Priscila Mazzola³, Edgar Silveira¹, Maria das Graças Carneiro-da-Cunha⁴, Adalberto Pessoa Jr.¹, Elias Tambourgi²

¹FCF – University of Sao Paulo - Av. Lineu Prestes, 580, 05508-000, Sao Paulo -SP, Brazil

²FEQ – State University of Campinas - P.O. Box 6066, 13083-970, Campinas-SP, Brazil

³FCF – State University of Campinas - Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 13087-887, Campinas-SP, Brazil

⁴UFPE – Federal University of Pernambuco - Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901, Recife-PE, Brazil

Brazil produces over than 58.000 hectares of pineapple, being the world leader in pineapple production. Aiming the recovery of agriculture residues (stalk and leaves), and fruit processing residues (stem and bark), several researches have been carried out for the recovery of pineapple's enzymes, such as the bromelain. These enzymes performs important role in proteolytic modulation at cellular matrix, in numerous physiologic process, including tissue morphogenesis, tissue repair, angiogenesis and tissue modulation, decreasing bruises, swelling, pain and healing time. This work aims the recovery on bromelain from pineapple stem, bark and leaves. Aqueous extract of bromelain was prepared through stem, bark and leaves processing in a common blender. Precipitation studies were performed under refrigeration (4 °C). Poly(ethylene glycol) precipitations were carried out in a single step, in various concentrations. Ethanol and ammonium sulphate precipitations were carried out stepwise, where several concentrations of ethanol and ammonium sulphate were added to perform a fractional precipitation. Results showed that bromelain was not precipitated by poly(ethylene glycol) at all. However, bromelain was recovered with 30-70% ethanol fraction, in which were achieved a purification factor of 2.07 fold, and yielded over than 98% of enzymatic activity. Precipitation with ammonium sulphate showed that bromelain was recovered at 20-40 saturation fractions, yielding up to 44% of protein recovery, and a purification factor of 4.4 fold. Although the ethanol precipitation had achieved a lower purification factor, it seems to be more suitable for bromelain recovery, based on process time and local ethanol price, since Brazil is the largest ethanol producer worldwide.

5.1.1 Introduction

The pineapple (*Ananas comosus* L.) is cultivated extensively in Hawaii, Philippines, Caribbean, Malaysia, Australia, Mexico, South Africa and Brazil. Brazil is the second producer worldwide with more than 58,000 hectares planted. The main producer areas are the rain forest and country's northeast, although it is cultivated all around the country (Silveira et al., 2009).

The stem bromelain (formerly E.C. 3.4.22.4) is extracted from *A. comosus*, considered by many to be a whole fruit, it is in fact an infructescence: many independent fruits are bound together in one common body around a fibrous stem. The stem bromelain (E.C. 3.4.22.32) is the most abundant cysteine endopeptidase in pineapple's stem, leaves and skin. It exhibits a broad specificity for protein cleavage, having a strong preference for Arg-Arg-|-NHMe among other substrates (Haq et al., 2005, Harrach et al., 1998).

Bromelain belongs to a group of proteolytic enzymes, which are used as drugs for oral systemic treatment of inflammatory, blood-coagulation-related and malignant diseases. These enzymes offer a wide spectrum of therapeutic efficacies: they demonstrate, in vitro and in vivo, antiedematous, anti-inflammatory, antithrombotic and fibrinolytic activities (Maurer, 2001).

Bromelain is a crude extract constituting an unusually complex mixture of different thiol-endopeptidases and other not yet completely characterized components such as phosphatases, glycosidases, peroxidases, cellulases, glycoproteins and carbohydrates, among others (Rowan et al., 1990). Nowadays, bromelain is prepared from cooled pineapple juice by centrifugation, ultrafiltration and lyophilisation. This process yields a yellowish powder with 40% of protein content (Harrach et al., 1998).

This work describes the studies on bromelain precipitation with ethanol, ammonium sulphate and poly(ethylene glycol) as an alternative process for the production of commercial bromelain.

5.1.2 Materials and Methods

5.1.2.1 Enzyme Extract

The enzymatic extract, referred to as crude extract for now on, was obtained from *Ananas comosus*'s stem, bark and leaves. The vegetable tissue was processed in a common blender and then filtered on cheesecloth and centrifuged at 2000x G for 20 minutes at 4°C for insoluble particles removal.

5.1.2.2 Protein and Enzyme Activity Assay

The protein concentration was determined by the method described by Bradford (1976). The Enzymatic Activity Assay was performed by the azocasein method, as described by Oliveira et al. (2006). Azocasein 1.0% (w/v) (Sigma) was solubilized in ethanol 4% (v/v) and 200 mM phosphate buffer, pH 7.0, and used as substrate. One activity unit was defined as the amount of bromelain needed to produce 1 µmol tyrosine per minute at 37 °C.

5.1.2.3 Poly(Ethylene Glycol) Precipitation

The poly(ethylene glycol) precipitation was carried out according to the methodology described by Walker (2002). A solution of PEG 1500, 4000 and 6000, each in several concentrations (10 to 50% w/w) and cooled to 4°C, was slowly added to the crude extract in a jacked Becker at 4°C and homogenized by 20 minutes. The resultant solution was centrifuged at 2000x G for 20 minutes at 4°C, and the resulting pellet was resolubilized in 200 mM Phosphate Buffer, pH 7.0.

5.1.2.4 Ammonium Sulphate Precipitation

Ammonium Sulphate precipitation was performed by the method described by England and Seifter (1990), where solid $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ was added to 0°C cooled crude extract until the desired saturation (20%, 40%, 60%, 80% and 100%) was reached. After each step, the solution was centrifuged at 2000x G for 20 minutes at 4°C, and the resulting pellet was resolubilised in 200 mM Phosphate Buffer, pH 7.0.

5.1.2.5 Ethanol Precipitation

The ethanol precipitation was performed according to the methodology described by England and Seifter (1990). Ethanol was cooled to 0°C and added dropwise in the crude extract until the desired concentration (10 to 90% v/v) was achieved. The solution was then centrifuged at 2000x G for 20 minutes at 4°C, and the resulting pellet was resolubilised in 200 mM Phosphate Buffer, pH 7.0.

5.1.3 Results and Discussion

It was observed that PEG would not precipitate bromelain, nor any other *A. comosus*'s proteins. The PEG precipitation of proteins is well documented in literature (Fontes et al., 2005, Kumar et al., 2009); however, it emphasizes the solubility of serum proteins. Kumar et al. (2009) described that PEG would decrease the solubility of BSA from 0.6 mg/ml to less than 0.1 mg/ml after addition of 18% (w/v) of PEG 400 or 25% (w/v) of PEG 1450. Fontes et al. (2005) reported the precipitation of whole virus, in which had an initial protein content of 0.82 mg/ml. The lack of precipitation at the *Ananas comosus*'s proteins over PEG addition should be a result of the little concentration of total proteins at the crude extract, less than 0.3 mg/ml.

Table 5 shows the effects of Ammonium Sulphate saturation on bromelain precipitation. The crude extract produced five pools of proteolytic activity successively separated by ammonium sulphate precipitation. It was observed that more than 44% of total activity was collected in the 20-40%'s saturation fraction. This activity is probably due to bromelain itself, since it is the most abundant endopeptidase in the crude extract and should be soluble in solutions with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation less than 20%. Narayan et al. (2008) reported that increasing $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration, the purification degree decreased significantly. As in conventional salting out, the extent of protein precipitation is a function of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration (Roy and Gupta, 2000).

Table 5: Effects of ammonium sulphate saturation on bromelain precipitation

| | Protein Concentration (mg.mL⁻¹) | Bromelain Activity (U.mL⁻¹) | Specific Activity (U.mg⁻¹) | Y (%) | Purification Factor |
|----------------------|---|---|--|--------------|----------------------------|
| Crude Extract | 0.201 | 16.25 | 80.85 | -- | -- |
| 0-20% | 0.005 | 0.13 | 24.69 | 2.62 | 0.31 |
| 20-40% | 0.089 | 31.97 | 359.28 | 44.27 | 4.44 |
| 40-60% | 0.054 | 3.06 | 56.93 | 26.74 | 0.70 |
| 60-80% | 0.036 | 2.00 | 55.59 | 17.90 | 0.69 |
| 80-100% | 0.006 | 0.21 | 34.03 | 3.07 | 0.42 |

Devakate et al. (2009) described the precipitation of fruit bromelain (E.C. 3.4.22.5) with ammonium sulphate, where it achieved 2.97 fold in the 40-70% saturation range. However, the fruit bromelain is a completely different enzyme, as in biochemical characteristics as in physiological functions, from stem bromelain, which should explain this discrepancy.

Table 6 shows the effects of ethanol concentration in bromelain precipitation. Whenever ethanol concentrations on crude extract were over than 60% (v/v), the enzymatic activity recovery was near its initial value. It was also observed that with 30% of ethanol (v/v) there was no bromelain precipitation. However, under these conditions more than 26% of proteins presented in crude extract were precipitated. Ethanol precipitation was then performed in two steps, 0-30 and 30-70%, and so it was possible to extract bromelain without any loss in its activity and with an increase on purification factor from 1.13 to 2.34.

Table 6: Effects of ethanol concentration on bromelain precipitation

| | Protein Concentration (mg.mL⁻¹) | Bromelain Activity (U.mL⁻¹) | Specific Activity (U.mg⁻¹) | Y (%) | Purification Factor |
|----------------------|---|---|--|--------------|----------------------------|
| Crude Extract | 0.201 | 16.25 | 80.85 | N.A. | N.A. |
| 0-30% | 0.052 | 0.00 | 0.00 | 26.01 | 0.00 |
| 30-70% | 0.084 | 15.96 | 189.5 | 41.91 | 2.34 |

Cesar (1999) achieved, in a single step, total bromelain recovery from *A. comosus* with 80% of ethanol (v/v), and increased the specific activity 5 times. Rabelo (2004) described bromelain recovery using thermoseparating aqueous two-phase systems, in which was obtained a purification of 1.25 fold. Umesh Hebbar et al. (2008) achieved 106% of bromelain activity recovery and purification factor of 5.2 fold from *A. comosus* wastes when using reversed micelles systems.

The main purpose of using a precipitation method, such as ammonium sulphate or ethanol, is to concentrate the target molecule. Concentration is a necessary step to reduce the volume making it easier to handle for further purification, especially when it is integrated with a purification step. Thus considering the economics, it is always advisable to include a concentration step, even though if there is a compromise in the yield. Therefore, even doing a simple precipitation step, such as ethanol or ammonium sulphate fractionation, it is possible to purify considerably the enzyme presented in *A. comosus*'s wastes. It also represents a cost saving procedure, since it would reduce the overall steps number in biomolecule purification.

5.1.4 Conclusions

The bromelain was precipitated by ammonium sulphate mainly at the 20-40% saturation fraction yielding a purification factor of 4.44. Ethanol precipitation, on other hand, yielded 2.07. Bromelain was not precipitated by poly(ethylene glycol) whatsoever. Although ethanol precipitation had achieved a lower purification factor, it seems to be more suitable for bromelain recovery, based on process time, low ionic strength (which is desirable for further purification steps) and the local ethanol prices, since Brazil is the largest ethanol producer worldwide.

5.1.5 References

- BRADFORD, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**. 72, 248-254.
- CESAR, A.C., SILVA, R. and LUCARINI, A.C., 1999, Recuperação das enzimas presentes na casca e no talo do abacaxi, **Revista de Iniciação Científica** - São Carlos/SP. 1, 47-53.
- DEVAKATE, R.V., PATIL, V.V., WAJE, S.S. and THORAT, B.N., 2009, Purification and drying of bromelain, **Separation and Purification Technology**. 64, 259-264.
- ENGLARD, S. and SEIFTER, S., 1990, Precipitation techniques. in: **Guide to protein purification**, Eds. Deutscher, M.P., Academic Press, San Diego, USA.
- FONTES, L.V.Q., CAMPOS, G.S., BECK, P.A., BRANDO, C.F.L. and SARDI, S.I., 2005, Precipitation of bovine rotavirus by polyethylen glycol (PEG) and its application to produce polyclonal and monoclonal antibodies, **Journal of Virological Methods**. 123, 147-153.
- HAQ, S.K., RASHEEDI, S., SHARMA, P., AHMAD, B. and KHAN, R.H., 2005, Influence of salts and alcohols on the conformation of partially folded intermediate of stem bromelain at low pH, **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 37, 361-374.
- HARRACH, T., ECKERT, K., MAURER, H.R., MACHLEIDT, I., MACHLEIDT, W. and NUCK, R., 1998, Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinase, **Journal of Protein Chemistry**. 17, 351-361.
- KUMAR, V., SHARMA, V.K. and KALONIA, D.S., 2009, Effect of polyols on polyethylene glycol (PEG)-induced precipitation of proteins: Impact on solubility, stability and conformation, **International Journal of Pharmaceutics**. 366, 38-43.
- MAURER, H.R., 2001, Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use, **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**. 58, 1234-1245.
- NARAYAN, A., MADHUSUDHAN, M. and RAGHAVARAO, K., 2008, Extraction and Purification of Ipomoea Peroxidase Employing Three-phase Partitioning, **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 151, 263-272.
- OLIVEIRA, L.A., PORTO, A.L.F. and TAMBOURGI, E.B., 2006, Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes, **Bioresource Technology**. 97, 862-867.

RABELO, A.P.B., TAMBOURGI, E.B. and PESSOA, A., 2004, Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers, **Journal of Chromatography B**. 807, 61-68.

ROWAN, A.D., BUTTLE, D.J. and BARRETT, A.J., 1990, The cysteine proteinases of the pineapple plant, **Biochem. J.** 266, 869-875.

xz

ROY, I. and GUPTA, M.N., 2000, Current trends in affinity-based separations of proteins/enzymes, **Current Science**. 78, 587-591.

SILVEIRA, E., SOUZA-JR, M.E., SANTANA, J.C.C., CHAVES, A.C., PORTO, A.L.F. AND TAMBOURGI, E.B., 2009, Expanded bed adsorption of bromelain (E.C. 3.4.22.33) from Ananas comosus crude extract, **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. 26, 149-157.

UMESH HEBBAR, H., SUMANA, B. AND RAGHAVARAO, K.S.M.S., 2008, Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes, **Bioresource Technology**. 99, 4896-4902.

WALKER, J.M., 2002, **The Protein Protocols Handbook**. Humana Press, Totowa, New Jersey.

5.2 Purificação de Bromelina dos Resíduos de Abacaxi (*Ananas comosus*) por Sistemas Bifásicos Aquosos PEG/Sal

Diego F. Coelho¹, Paulo Soares^{2,3}, Maria G. Carneiro-da-Cunha², Edgar Silveira³, Adalberto Pessoa Jr³, Elias B. Tambourgi¹.

¹Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia Química, 13083-970, Campinas – SP

²Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Bioquímica, 50670-420, Recife – PE

³Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 05508-000, São Paulo – SP

E-mail: dfcoelho@feq.unicamp.br

Resumo

*Devido à dimensão da produção mundial de abacaxi (*Ananas comosus* L.) e ao grande percentual de resíduos gerados em seu cultivo e processamento, várias pesquisas têm sido realizadas para a recuperação das enzimas presentes no abacaxi, como a bromelina. Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de endopeptidases oriundas dos membros pertencentes à família Bromeliacea, à qual pertence o abacaxi. Devido aos importantes papéis fisiológicos que desempenham, estas enzimas oferecem um amplo espectro de aplicações terapêuticas comprovadas. Este trabalho visa à purificação da bromelina a partir dos resíduos do abacaxi através de Sistemas Bifásicos Aquosos (SBAs) PEG/SAL utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 e Fosfato de Potássio. Os resultados mostraram que não há formação de SBA utilizando o CaCl_2 na faixa utilizada de seus constituintes. Contudo, os sistemas PEG/Fosfato e PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentaram excelentes resultados, recuperando a bromelina com fator de purificação de 7,4 e 10,7 vezes, respectivamente, e rendimentos acima de 80%.*

Palavras-chave: Bromelina, Sulfato de Amônio, Purificação, Sistemas Bifásicos Aquosos.

5.2.1 Introdução

O abacaxi (*Ananas comosus* L.), originário das Américas, é cultivado na Ásia, na África, nas Américas (Norte, central e Sul) e na Europa, sendo seu fruto consumido tanto na forma fresca como industrializada. O Brasil, um dos líderes mundiais em sua produção, cultiva mais de 60.000 hectares de abacaxi (Ibge, 2009).

O grande percentual de resíduos gerados durante a usinagem, cerca de 60% do peso total do fruto, contém quantidades apreciáveis de Bromelina, uma protease com inúmeras aplicações nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, que possui alto valor agregado e que, diferentemente da papaína, não desaparece quando o fruto amadurece (Sriwatanapongse et al., 2000), gerando assim um número crescente de estudos de processos de recuperação e purificação da mesma.

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de endopeptidases encontradas no abacaxi e, na verdade, a todas as proteases oriundas dos membros pertencentes à família Bromeliaceae (Kennedy e Turan, 2004).

Seguindo esta definição, estas enzimas foram nomeadas com números sistemáticos IUDMB: EC 3.4.22.32 e EC 3.4.22.33, para a bromelina do talo e fruto, respectivamente (Kennedy e Turan, 2004).

Essas enzimas oferecem um amplo espectro de aplicações terapêuticas comprovadas: demonstrando, *in vitro* e *in vivo*, atividades anti-inflamatórias, antitrombóticas e fibrinolíticas (Maurer, 2001), dando origem a medicamentos para o tratamento oral sistêmico de doenças inflamatórias e para doenças relacionadas à coagulação sanguínea.

Atualmente, a bromelina é preparada através da ultrafiltração, centrifugação e liofilização do suco refrigerado de abacaxi. Este processo produz um pó amarelado com 40% de teor de proteína (Larocca et al., 2010).

As vantagens dos Sistemas Bifásicos Aquosos (SBAs) são bem conhecidas e incluem, entre outras, biocompatibilidade, alta área de contato interfacial e simplicidade de operação dos processos.

Deste modo, este estudo se concentra em descrever, comparativamente aos demais, a alta adequabilidade do sulfato de amônio como componente em sistemas bifásicos aquosos, constituindo um processo alternativo de purificação da bromelina. Para tal, utilizar-se-á planejamento fatorial para avaliar a influência das variáveis no fator de purificação e rendimento do processo.

5.2.2 Material e Métodos

5.2.2.1 Extrato Enzimático

O extrato enzimático foi obtido a partir da casca, talo e folhas do abacaxi (*Ananas comosus*), estes resíduos foram coletados em supermercados locais. O material recolhido foi então triturado em processador de alimentos à temperatura ambiente (25 ± 3 °C), duplamente filtrado em tela de nylon (120 mesh), para retirada de fibras e particulados em suspensão, e posteriormente centrifugados a 5000x G por 20 minutos a 4 °C para remoção do material insolúvel. O sobrenadante (extrato bruto) seguiu para a realização dos ensaios posteriores.

5.2.2.2 Determinação de Proteínas Totais e Atividade Enzimática

A concentração total de proteínas foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976). O ensaio de atividade enzimática foi realizado através do método da azocaseína, como descrito por Oliveira et al. (2006), onde azocaseína 1,0% (m/v, Sigma) foi solubilizada em 4% de etanol (v/v) e tampão fosfato 200 mM, pH 7,0, e utilizados como substrato. A mistura de ensaio, contendo 125 µL de substrato e 125 µL de extrato enzimático foi incubada por 10 minutos a 37 °C, sendo a reação interrompida pela adição de 750 µL de ácido tricloroacético 5% (m/v, Synth).

As amostras foram então centrifugadas à 4000x G por 10 minutos e a uma temperatura de 5 °C. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir o aumento na densidade ótica em uma unidade no intervalo de uma hora.

A atividade específica foi calculada pela razão entre a atividade proteolítica total e a concentração total de proteínas da amostra. Seus resultados, então, são expressos em unidades de atividade por miligrama de proteína ($U \cdot mg^{-1}$).

5.2.2.3 Rendimento e Fator de Purificação

A fração de proteínas totais (Y_P^t) para a fase superior foi calculado através da equação abaixo, que relaciona os volumes das fases às concentrações proteicas das mesmas.

$$Y_P^t = \frac{100}{\left(1 + \frac{V_b}{V_t} \cdot \frac{C_P^t}{C_P^b}\right)}$$

Sendo V o volume, C_P^{fase} a concentração total de proteínas. Os subscritos t e b referem-se às fases cujas variáveis representam: superior ou inferior, respectivamente. O cálculo da fração de bromelina particionada (Y_B^t) foi, então, adaptado da equação anterior. Assim:

$$Y_B^t = \frac{100}{\left(1 + \frac{M_b}{M_t} \cdot \frac{S_A^t}{S_A^b}\right)}$$

Onde M_{fase} é a massa total de proteínas e S_A^{fase} é a atividade específica estimados na fase indicada pelo respectivo subscrito. O fator de purificação foi calculado pela razão entre a fração de bromelina e a fração total de proteínas.

5.2.2.4 Planejamento Experimental e Preparo dos Sistemas Bifásicos Aquosos

Para delinear as condições de processo dos SBAs PEG/CaCl₂ e PEG/(NH₄)₂SO₄ utilizou-se um planejamento experimental fatorial, cujas variáveis estudadas foram: concentração do sal, massa molar do PEG e concentração do PEG (Barros Neto et al., 2010). Para o sistema PEG/Fosfato, acrescentou-se ao planejamento o pH como variável estudada. Em todos os casos, o fator de purificação (P_F^{fase}) foi escolhido como variável resposta. A

tabela 7 apresenta os níveis das variáveis independentes reais e codificadas.

Tabela 7: Planejamento Experimental Fatorial $2^4 + 3 \cdot P_C$, para o Fosfato, e $2^3 + 3 \cdot P_C$ para os demais sais.

| Variáveis | PEG/Fosfato | | | | PEG/CaCl ₂ ou (NH ₄) ₂ SO ₄ | | |
|-------------------|-------------|-------|-------|-------|--|-------|-------|
| | pH | [Sal] | [PEG] | MMPEG | [Sal] | [PEG] | MMPEG |
| Nível -1 | 6 | 13% | 15% | 2000 | 15% | 15% | 2000 |
| Nível 0 (P_C) | 7 | 14% | 17,5% | 4000 | 20% | 17,5% | 4000 |
| Nível 1 | 8 | 15% | 20% | 6000 | 25% | 20% | 6000 |

Concentrações percentuais dadas em m/m.

Os sistemas, com massa total individual de cinco gramas (Sal + PEG + extrato bruto + água), foram elaborados conforme o planejamento. Após a adição dos componentes, os sistemas foram agitados vigorosamente em vórtex por 180 segundos; centrifugados a 3000x G por 10 minutos e tiveram alíquotas retiradas das fases formadas para realização das análises. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, bem como as análises que sucederam a separação das fases dos SBAs.

5.2.3 Resultados e Discussões

A tentativa de utilização de CaCl₂ neste trabalho se baseou nos estudos realizados por Biazus et al. (2007). Contudo, os experimentos demonstraram que não há formação de SBA utilizando o CaCl₂ na faixa de constituintes utilizada. Os Sistemas PEG/Fosfato na faixa de pH trabalhada e à temperatura ambiente foram escolhidos baseado em Ferreira (2007). Nesta faixa de pH, a atividade proteolítica da enzima encontra-se em seu máximo (Ferreira et al., 2011). Segundo Klomklao et al. (2005), o vasto número de estudos realizados em sistemas PEG/Sal, cujo diferencial consiste no aprimoramento da partição da molécula alvo pelo sal, mostrou que, após a separação das fases, a bromelina é particionada proeminentemente para a fase polimérica, principalmente em sistemas cuja característica hidrofóbica se assemelha às enzimas. Nestes sistemas, o particionamento de biomolécula depende, dentre outros fatores, do efeito do volume de exclusão do polímero na fase polimérica e do *salting-out* na fase rica em sal (Babu et al., 2008).

Os resultados dos estudos com o sistema PEG/Fosfato (ver tabela 8) mostram que o experimento com maior valor para o fator de purificação foi aquele cuja composição era: 15% para o fosfato, 15% para o PEG, 2000 MMPEG e pH 8. Nestas condições, foi obtido rendimento de 89,9% e fator de purificação de 8,5 vezes.

Tabela 8: Resultados da Purificação do Sistema PEG/Fosfato

| Experimento | pH | [Sais] | [PEG] | MMPEG | P_F^t | Y_B^t |
|--------------------|-----------|---------------|--------------|--------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 0,73 | 37,59 |
| 2 | -1 | -1 | -1 | 1 | 0,96 | 62,37 |
| 3 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1,81 | 76,56 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | 1 | 7,70 | 88,21 |
| 5 | 1 | -1 | 1 | -1 | 5,80 | 97,12 |
| 6 | -1 | -1 | 1 | 1 | 0,67 | 46,20 |
| 7 | 1 | 1 | 1 | -1 | 4,97 | 83,35 |
| 8 | -1 | 1 | 1 | -1 | 0,75 | 45,72 |
| 9 | -1 | 1 | -1 | -1 | 0,96 | 50,21 |
| 10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 7,76 | 97,91 |
| 11 | -1 | 1 | 1 | 1 | 0,48 | 41,13 |
| 12 | 1 | 1 | -1 | -1 | 8,50 | 89,89 |
| 13 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1,64 | 56,13 |
| 14 | 1 | -1 | -1 | -1 | 3,12 | 76,46 |
| 15 | -1 | -1 | 1 | -1 | 0,70 | 51,92 |
| 16 | 1 | -1 | 1 | 1 | 2,86 | 83,40 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,05 | 69,65 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,11 | 67,58 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,06 | 69,81 |

Estes resultados, muito embora sejam inferiores aos encontrados por Ferrari et al. (2011), refletem as condições experimentais utilizadas e são válidos para este estudo comparativo.

A tabela 9 mostra os resultados obtidos para a purificação da bromelina utilizando o sulfato de amônio. Observa-se, então, que os resultados obtidos para o fator de purificação foram superiores àqueles obtidos, concentrando em aproximadamente 10 vezes a molécula alvo.

Tabela 9: Resultados da Purificação da bromelina por Sistemas Bifásicos Aquosos PEG/(NH₄)₂SO₄

| Experimentos | MMPEG | [PEG] | [(NH ₄) ₂ SO ₄] | P _F ^t | Y _B ^t |
|--------------|-------|-------|--|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 | -1 | -1 | -1 | 1,00 | 50,00 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | 2,74 | 86,48 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | 1,74 | 75,07 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | 2,30 | 84,15 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | 8,00 | 83,17 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | 8,70 | 87,90 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | 4,91 | 84,08 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 4,51 | 85,64 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 10,57 | 88,27 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 10,78 | 88,24 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 10,76 | 87,86 |

A figura 7 apresenta os dados dos fatores de purificação (P_F^t) e as frações de proteínas totais (Y_P^t) e de bromelina particionadas para a fase superior (Y_B^t) para ambos os sistemas formados com sucesso.

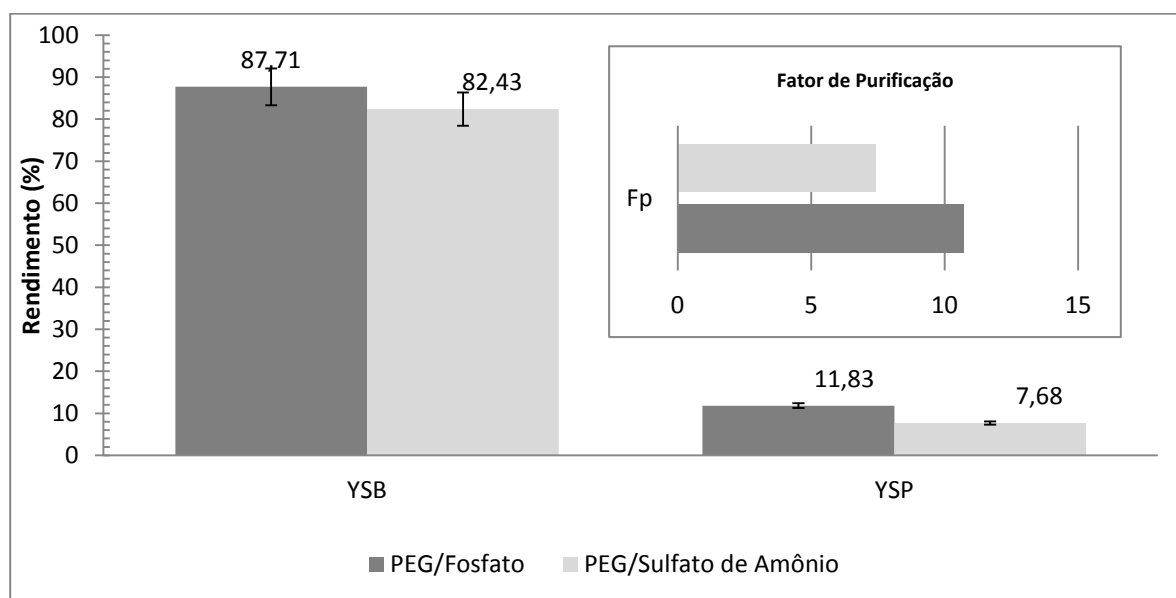


Figura 7 - Fator de purificação, fração de proteínas totais e de bromelina para os sistemas PEG/Fosfato e PEG/(NH₄)₂SO₄ em suas respectivas condições ótimas.

Tais dados mostram que o sistema PEG/Fosfato recuperou uma maior fração de bromelina, particionando a mesma para a fase rica em PEG, juntamente com a maior parte das proteínas. Contudo, analisando-se o fator de purificação vê-se claramente que o sal mais adequado ao processo é o sulfato de amônio.

Soares et al. (2011) alcançou, em uma única etapa, 44% de rendimento na recuperação de bromelina a partir de resíduos de abacaxi, aumentando em quatro vezes a atividade específica. Umesh Hebbar et al. (2008), utilizando sistemas com micelas reversas, obteve 106% de recuperação da atividade enzimática e um fator de purificação de 5,2 vezes.

O principal objetivo de técnicas de baixa resolução como os sistemas aquosos bifásicos é concentrar a molécula alvo. Contudo, a manipulação dos parâmetros dos sistemas estudados pode aumentar a seletividade da partição e purificar consideravelmente a bromelina, possibilitando a redução de etapas no processo de obtenção da mesma.

5.2.4 Conclusões

Observou-se que o emprego do cloreto de cálcio é inadequado, pois não leva à formação de um sistema bifásico. Os sistemas PEG/Fosfato mostraram-se bastante eficientes, atingindo rendimento acima de 80% e fator de purificação de 8,5 vezes. Contudo, os melhores resultados para a purificação da bromelina foram obtidos por SBAs PEG/(NH₄)₂SO₄, alcançando um fator de purificação de 10,7 vezes no sistema PEG4000 (20%) – (NH₄)₂SO₄(25%), demonstrando que houve uma concentração seletiva da molécula alvo na fase polimérica deste sistema.

5.2.5 Referências Bibliográficas

BABU, R. B.; RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. **Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system.** Amsterdam, PAYS-BAS: Elsevier, 2008. 7.

BARROS NETO, B. D.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, E. **Como Fazer Experimentos - Aplicações na Ciência e na Indústria.** 4th. Bookman, 2010. 414 ISBN 9788577806522.

BIAZUS, J. P. M. et al. Continuous extraction of [alpha]- and [beta]-amylases from Zea mays malt in a PEG4000/CaCl₂ ATPS. **Journal of Chromatography B**, v. 858, n. 1-2, p. 227-233, 2007. ISSN 1570-0232.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697.

FERREIRA, J. F. **Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato.** 2007. 97 Dissertação de Mestrado Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FERREIRA, J. F.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. The effect of pH on bromelain partition from Ananas comosus by PEG4000/phosphate ATPS. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, p. 125-132, 2011. ISSN 1516-8913.

HEBBAR, H. U.; SUMANA, B.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4896-4902, 2008. ISSN 0960-8524.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal - PAM.** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Rio de Janeiro, p.93. 2009. (0101-3963)

KENNEDY, J.; TURAN, N. **Handbook of Proteolytic Enzymes.** 2. Academic Press, 2004. 2368 ISBN 978-0-12-079610-6.

KLOMKLAO, S. et al. Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 3061-3067, 2005. ISSN 1359-5113.

LAROCCA, M.; ROSSANO, R.; SANTAMARIA, M.; RICCIO, P. Analysis of pineapple [Ananas comosus (L.) Merr.] fruit proteinases by 2-D zymography and direct identification of the major zymographic spots by mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1334-1342, 2010. ISSN 0308-8146.

MAURER, H. R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 9, p. 1234-1245, 2001. ISSN 1420-682X.

OLIVEIRA, L. A.; PORTO, A. L. F.; TAMBOURGI, E. B. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 862-867, 2006. ISSN 0960-8524.

SOARES, P. et al. Studies on Bromelain Precipitation by Ethanol, Poly(Ethylene Glycol) and Ammonium Sulphate. **Chemical Engineering Transactions**, v. 24, p. 5, 2011. ISSN 1974-9791.

SRIWATANAPONGSE, A.; BALABAN, M.; TEIXEIRA, A. **Thermal inactivation kinetics of bromelain in pineapple juice**. St. Joseph, MI, ETATS-UNIS: American Society of Agricultural Engineers, 2000.

5.3 Bromelain Purification through Unconventional Aqueous Two-Phase System (PEG/Ammonium Sulphate)

D. F. Coelho^{a,*}, E. Silveira^{b,a}, A. Pessoa-Jr^b, E. B. Tambourgi^a

^aFaculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Av. Albert Einstein, 500 - CEP 13083-852 – Campinas, SP, Brasil

^bFaculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP) - Caixa Postal 580 – 05508-000, São Paulo, SP, Brasil

Abstract

This paper focuses on the feasibility of unconventional aqueous two-phase systems (ATPS) for bromelain purification from pineapple processing waste. The main difference in comparison to conventional systems is the integration of the liquid-liquid extraction technique with fractional precipitation, which can decrease the protein content with no loss of biological activity by removing of unwanted molecules. The analysis of the results was based on the response surface methodology and revealed that the use of the desirability optimisation methodology (DOM) was necessary to achieve higher purification factor values and greater bromelain recovery. The use of DOM yielded an 11.80-fold purification factor and 87.36% biological activity recovery using poly(ethylene glycol) (PEG) with a molar mass of 4000, 10.86% PEG concentration (m/m) and 36.21% saturation of ammonium sulphate.

Keywords: bromelain, unconventional ATPS, ammonium sulphate, poly(ethylene glycol), pineapple

5.3.1 Introduction

Many biotechnological processes include recovery steps for the selective separation of a protein from a variety of complex media, but the low concentration and the similarity between the physicochemical properties of the proteins make the selective separation of a target molecule very difficult and expensive. Thus, new biotechnological processes and downstream strategies have been developed to maximise product recovery from crude plant extracts, making the process economically feasible.

The industrial purification of biomolecules requires the use of techniques that have a high processing capacity but low resolving power, such as fractional precipitation with salt or organic solvents (Doonan and Cutler, 2004), at least in the early stages. Although these techniques can reduce costs by concentrating and purifying the target molecule and consequently reducing the total number of steps, the degree of purification decreases significantly with the increase in salt concentration, for example (Narayan *et al.*, 2008).

Aqueous two-phase systems (ATPS), on other hand, offer well-known benefits, such as high interfacial contact area of operation, biocompatibility and procedural simplicity. This process is based on the mass transfer between two immiscible liquids. In this kind of extraction, the separation of a specific component occurs by adding an immiscible or partially miscible liquid component (solvent) in which the target molecule is soluble. However, there are a limited number of adequate solvents for the separation of biomolecules due their molecular surface characteristics, which makes these molecules susceptible to denaturation in the presence of organic solvents (Albertsson, 1986; Zaslavsky, 1995).

Albertsson (1986) found that aqueous systems formed by soluble polymers and salts spontaneously separate into two immiscible phases in which there is no loss of biomolecule activity. Furthermore, it is possible to achieve very selective separation by adjusting the physicochemical parameters of the phases. Thus, aqueous two-phase systems have been successfully employed in the isolation and purification of proteins, viruses, membrane fragments and organelles.

The efficiency of biomolecule partitioning is measured by the partitioning coefficient K_p , which is defined as the ratio of the protein concentration in the top (C_p^t) and bottom (C_p^b) phases (as shown in Eq. 11) after reaching equilibrium and demonstrates the distribution of the biomolecule between the phases of system (Zaslavsky, 1995; Ferreira *et al.*, 2011).

$$K_p = \frac{C_p^t}{C_p^b} \quad (11)$$

Similarly, this coefficient can be used to express the partition of specific biological activity between phases, as described by the equation below:

$$K_A = \frac{S_A^t}{S_A^b} \quad (12)$$

5.3.1.1 Bromelain from pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill)

Brazil is one of the largest producers of pineapple in the world, with more than 60,000 hectares planted. The main production areas are the Atlantic rainforest and the northeast region of the country, although this fruit is cultivated throughout the entire country (Silveira *et al.*, 2009). The industrialisation of pineapple seeks the maximal yield of the raw material, but large percentages of waste are generated during processing. This waste, which totals nearly 60% of the weight of the product, contains appreciable amounts of bromelain, which is a protease with numerous applications in the food and pharmaceutical industries that has considerable added value and, unlike papain, does not disappear when the fruit ripens (Balls *et al.*, 1941).

Bromelain (formerly EC 3.4.22.32 and 3.4.22.33) is the general name given to the group of endopeptidases found in pineapple as well as all proteases derived from members of the family Bromeliaceae (Heinicke, 1953). These enzymes are used as drugs for the oral systemic treatment of inflammatory, blood-coagulation-related and malignant diseases, offering a wide spectrum of therapeutic applications with *in vitro* and *in vivo* antithrombotic and fibrinolytic activities (Maurer, 2001).

Bromelain has been administered in the treatment of allergic airway disease (Secor *et al.*, 2005), anticancer activity (Harrach *et al.*, 1994) and cosmetic compositions (Chatsworth, 1996). The optimal pH range and temperature of bromelain are 6.5 to 7.5 and 37 °C, respectively (Fischer *et al.*, 2007; Lopes *et al.*, 2009; Silveira *et al.*, 2009). During bromelain purification, the concentration of pineapple juice is required to retain proteolytic activity and standardise the composition, since the enzyme is deactivated spontaneously (Ferreira *et al.*, 2011). Currently, bromelain is prepared by the ultrafiltration, centrifugation and lyophilisation of cooled pineapple juice. This process produces a yellowish powder with 30 to 40% protein content (Larocca *et al.*, 2010), the price of which is about US\$ 7.095,00 per kilogram of purified material (Sigma, 2012).

Bromelain from pineapple has been purified by reverse micelles (Fileti *et al.*, 2009; Fileti *et al.*, 2010), aqueous two-phase systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers (Rabelo *et al.*, 2004) and membrane separation processes (Lopes *et al.*, 2009). However, even under the best operating conditions, these methods have not achieved a high enough purification factor to avoid polishing steps, such as exclusion molecular chromatography.

The aim of the present study was to investigate the application of ammonium sulphate in the purification of bromelain through fractional precipitation integrated to poly(ethylene glycol)/salt ATPS, resulting in a medium-resolution downstream technique. Furthermore, as pineapple has commercial applications, bromelain purification should be performed with waste (bark, leaves and stem) from its industrial processing. The response surface methodology (RSM) was used to evaluate influence of the selected variables on the purification factor (P_F).

5.3.2 Material and Methods

5.3.2.1 Enzyme extract

The aqueous extract was obtained from the processing of pineapple stems, bark and leaves in a common blender. The vegetal tissue was removed through filtration on a silk-screen filter (120 mesh) and centrifuged at 2000x G for 20 minutes at 4 °C for the removal of insoluble particles. The supernatant (crude extract) was used for further experiments.

5.3.2.2 Protein and enzyme activity assay

The protein concentration was determined using the method described by Bradford (1976). The enzyme activity assay was performed with the azocasein method, as described by Oliveira et al. (2006). The bioreactor, containing 125 µL of substrate and 125 µL of enzyme extract, was incubated for 10 minutes at 37 °C and the reaction was stopped with the addition of 750 µL of 5% trichloroacetic acid (w/v). The samples were centrifuged at 4000 G for 10 minutes at 5 °C. One unit of activity was defined as the amount of enzyme needed to produce an increase in optical density of 1.0 at 440 nm and 37 °C in one h.

Specific activity was calculated as the ratio of the total proteolytic activity and total protein concentration of the sample (Eq. 13). The results were expressed as activity units per milligram of protein (U·mg⁻¹).

$$S_A^{phase} = \frac{A^{phase}}{C_P^{phase}} \quad (13)$$

5.3.2.3 Fractional precipitation assay

The fractional precipitation curve of bromelain from pineapple extract was set up following the method described by England and Seifter (1990), in which solid $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was added to crude extract at 0 °C until the desired saturation was reached (10 to 100%, in 5% increments). After each step, the solution was centrifuged at 2000x G for 20 minutes at 4 °C and the resulting pellet was re-suspended in 200 mM of phosphate buffer, pH 7.0.

5.3.2.4 Experimental design (ATPS compositions)

The ATPSs were prepared by mixing poly(ethylene glycol) (PEG) (concentration: 15 to 25%; molar mass: 2000 to 6000), 200 mM of phosphate buffer, pH 7.0 (to achieve the total mass) and ammonium sulphate, the concentration range of which was determined by the fractional precipitation assay. The fraction of crude extract containing the enzyme of interest added to the system was 20%.

To explore all possible effects that may be relevant, design of experiments was employed to evaluate the variables in a full factorial design with three variables and two levels (Barros Neto *et al.*, 2010). Moreover, three central points were added to the design.

The purification factor (P_F) and bromelain yield (Y_E^{phase}) recovery were the response variables. The systems individually weighed a total of five grams (PEG + salt + buffer + pineapple extract). After preparation, the systems were shaken for 180 seconds in a vortex, centrifuged at 5 °C and 3000x G for 10 min to accelerate the formation of the phases and aliquots were taken from both phases (upper and lower) for analysis purposes. Based on the results of full factorial design, a 2^2 central composite design was carried out.

5.3.2.5 Unconventional ATPS – Theory and Calculations

The complex nature of the phenomena involved, taking into account the interaction between the partitioned substance and the component of each phase, required the effort of a number of scientists around the world in an attempt to understand the mechanical distribution of molecules between the two phases. The achievements thus far give ATPS all the characteristics of an ideal extraction technology for biomolecules due the low investment required, lesser energy consumption and lower labour costs.

Moreover, difficulties in the recycling process of the phase components make the process economically feasible only for high-priced products, for which the high yield, volume reduction and enrichment obtained make the costs tolerable (Gupta *et al.*, 1999).

On other hand, research into improving ATPS has boosted the development of new polymers and the employment of other groups of salts, leading to the development of novel phases, such as reverse micelle systems (Feitosa *et al.*, 2008).

The present paper proposes a unique modification to conventional aqueous two-phase systems by introducing a novel approach to this purification process through integration with a precipitation step. The essence of the method consists in the precipitation of unwanted biomolecules in parallel to the liquid-liquid extraction of the target molecule (figure 8).

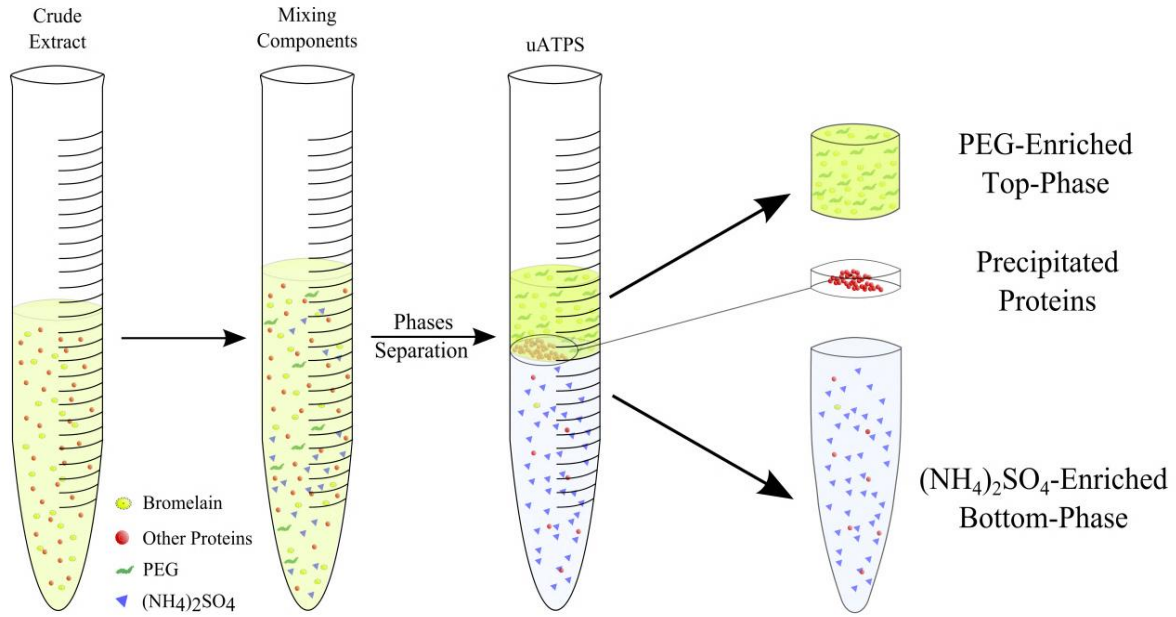


Figure 8 - Schematic of molecule distribution in unconventional aqueous two-phase system

This simple modification substantially improves the purification factor by reducing the total protein content with no proportional loss of proteolytic activity. Fractional precipitation is first performed to determine the highest concentration of salt that does not precipitate considerable amounts of bromelain. Based on this concentration, an overall enzyme recovery study is carried out through extraction by ATPS.

The amount of protein remaining in the liquid phase extracted into the top (Y_P^t) and bottom phase (Y_P^b) is determined by the following equations:

$$Y_P^t(\%) = \frac{100}{1 + \left(\frac{1}{K_P} \cdot \frac{V_b}{V_t} \right)} \quad (14)$$

and

$$Y_P^b(\%) = \frac{100}{1 + \left(K_P \cdot \frac{V_t}{V_b} \right)} \quad (15)$$

in which V_T and V_B are the volumes of the top and bottom phases, respectively.

The amount of the target molecule retained in each phase is a function of its volume, protein content and specific activity. Thus, for the top (Y_E^t) and bottom (Y_E^b) phases:

$$Y_E^t(\%) = \frac{100}{1 + \frac{K_P V_t}{K_A V_b}} \quad (16)$$

and

$$Y_E^b(\%) = \frac{100}{1 + \frac{K_A V_b}{K_P V_t}} \quad (17)$$

5.3.3 Results and Discussion

5.3.3.1 Fractional precipitation assay

Figure 9 displays a complete bromelain precipitation profile using ammonium sulphate. The values of the variables are for the supernatant phase. The 0-15% saturation range did not precipitate any protein. At 20% saturation, there was a substantial decrease in protein content and enzyme activity, with a subsequent decrease in the specific activity of the extract.

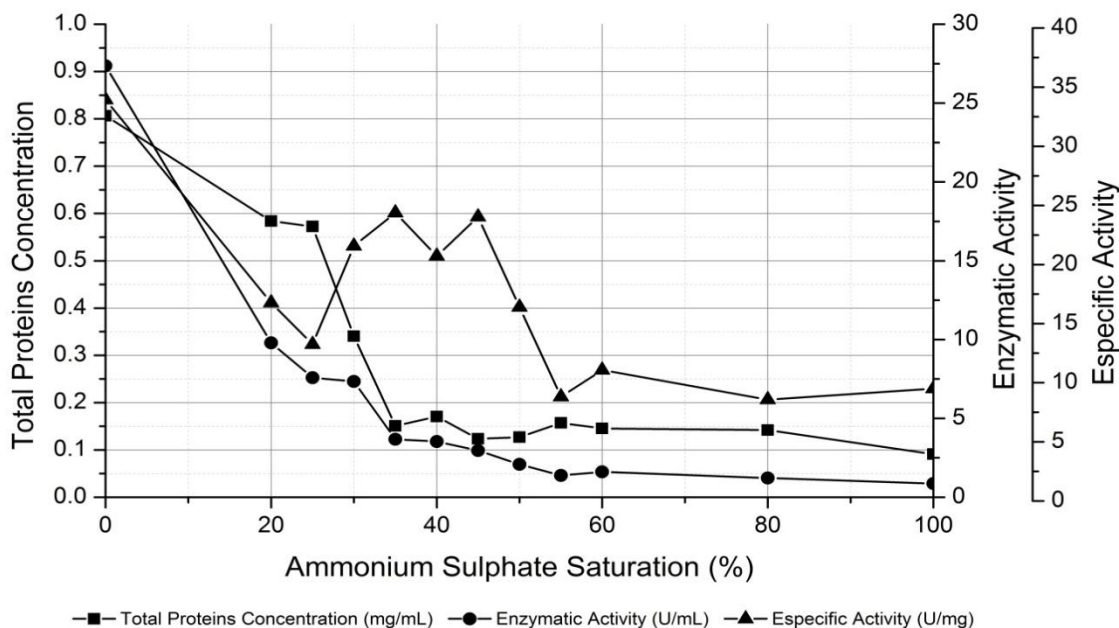


Figure 9 - Fractional precipitation profile of bromelain from pineapple waste

This behaviour was expected, as bromelain constitutes a group of proteolytic enzymes with significantly different structures and the precipitation phenomena essentially depend on the interaction between the solvent and molecule. Thus, some of these enzymes precipitate at different saturation ranges and often in overlapping ranges. In the 30 to 50% saturation range, there was a sharp decrease in protein content, with no proportional loss of enzyme activity, i.e., there was greater precipitation of the unwanted proteins (those without biological activity).

At the subsequent points, a small variation in activity was found in the supernatant, even with 100% salt saturation, indicating that a fraction of the target molecule cannot be recovered by this method.

Soares *et al.* (2011) obtained bromelain through fractional precipitation processes using ethanol and ammonium sulphate from pineapple waste. The authors found that more than 44% of total activity was obtained in the 20 to 40% saturation range with ammonium sulphate, whereas bromelain was precipitated in the 30 to 70% saturation range with ethanol. Devakate *et al.* (2009) describe the precipitation of fruit bromelain (E.C. 3.4.22.33) with ammonium sulphate, achieving a 2.97-fold increase in activity in the 40 to 70% saturation range. This discrepancy may be explained by the different biochemical characteristics found in fruit and stem bromelain.

5.3.3.2 uATPS experiments (RSM)

As mentioned above, the largest portion of biologically active bromelain precipitates in the 30 to 50% saturation range with the ammonium sulphate precipitation process. Thus, the concentration range used for ammonium sulphate in the ATPS experiments was that in which there was a decrease in protein content with no proportional loss of activity. This occurred at exactly 30% saturation, at which point there was a 56% reduction in protein content and a 35% decrease in specific activity. Thus, the decision was made to use 15% and 25% saturation respectively for the low and high levels to evaluate the effects of ammonium sulphate on bromelain purification. Table 10 displays all levels selected for the real and coded independent variables.

Table 10 - 2³ full factorial design of uATPS experiments

| | Factor | [(NH₄)₂SO₄] | [PEG] | MMPEG |
|---------------|---------------|---|--------------|--------------|
| Levels | -1 | 15% | 15% | 2000 |
| | 0 | 20% | 17.5% | 4000 |
| | 1 | 25% | 20% | 6000 |

As expected, all systems with ammonium sulphate saturation above 20% achieved the formation of a protein precipitate in the interphase region (figure 10). Furthermore, bromelain was partitioned to the PEG-enriched phase (top phase). The specific protease activity of precipitated proteins was not measured in all experiments due to its absence in the preliminary studies.

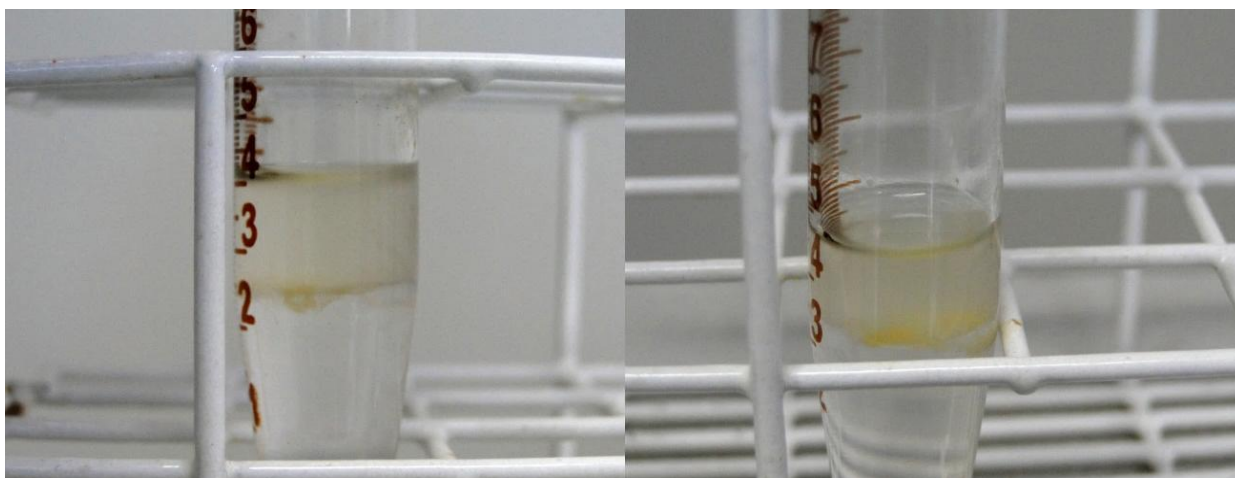


Figure 10 - Precipitated proteins in uATPS

The intention with the full factorial design was to detect the variables responsible for the variations in the partition of the target protein. These effects are illustrated in figure 11 and figure 12, which also demonstrate that only the PEG concentration did not have a significant effect over the purification factor of the systems studied. The "curvature" in these figures is an indication of the direction on the response surface in which an improved performance for the variable selected is demonstrated.

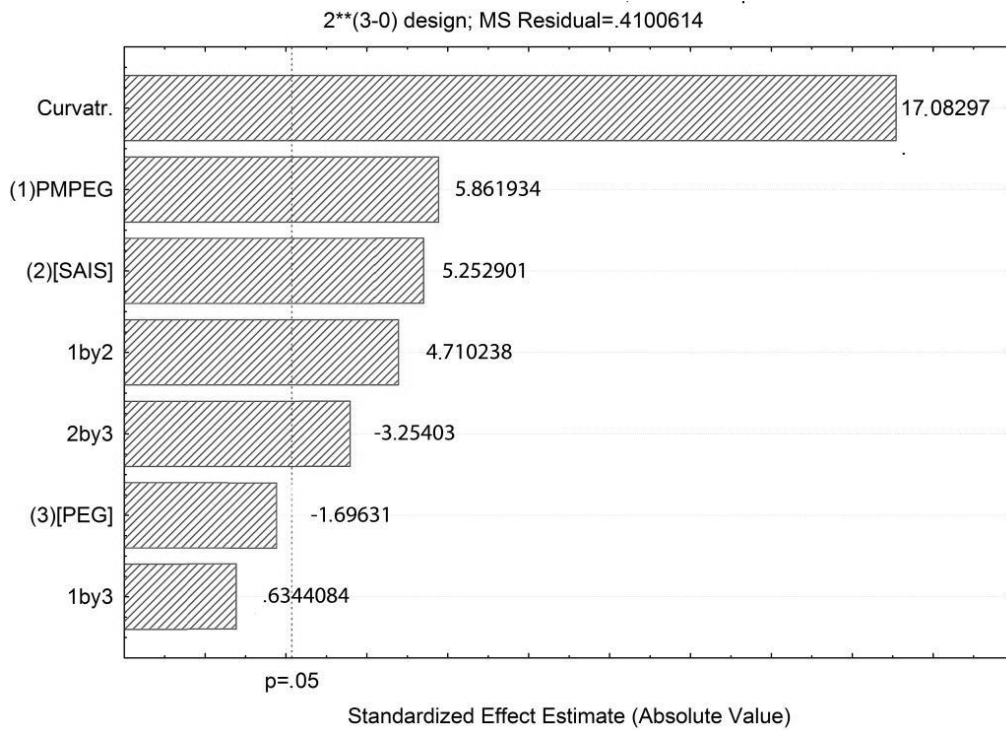


Figure 11 - Pareto chart of standardised effects for purification factor (P_F^S) in top phase

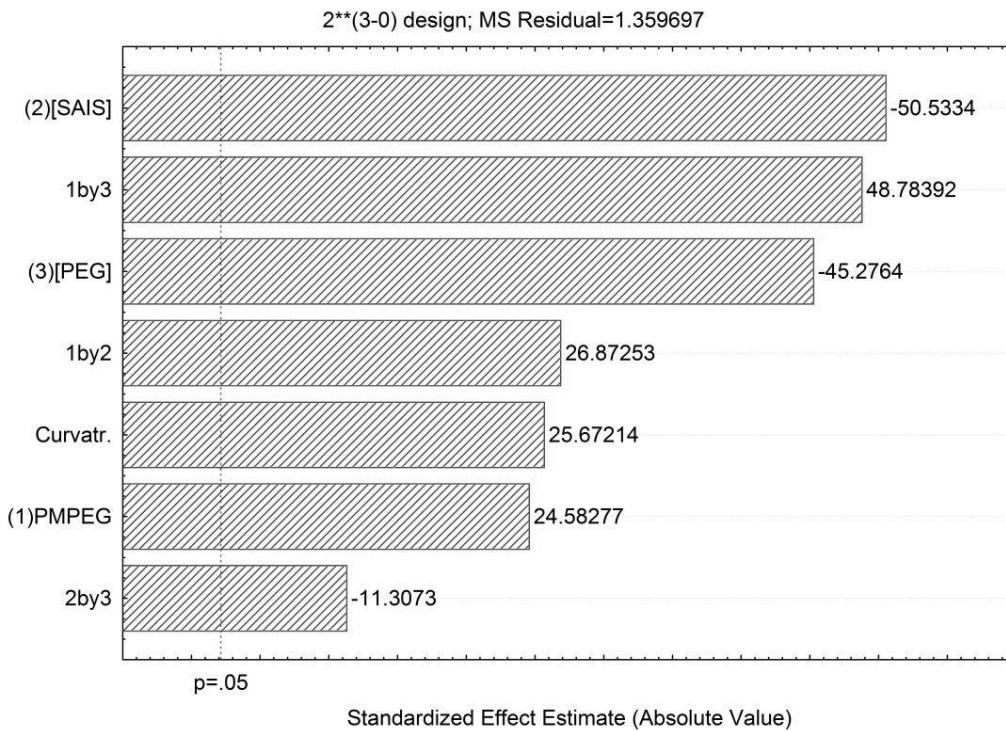


Figure 12 - Pareto chart of standardised effects for bromelain yield in top phase ($Y_E^t(\%)$)

Nevertheless, there is a trade-off between the purification factor and yield of the process, i.e., the operating conditions that lead to an increase in the purification factor (Figure 13.A) cause a decrease in bromelain purification yield (Figure 13.B).

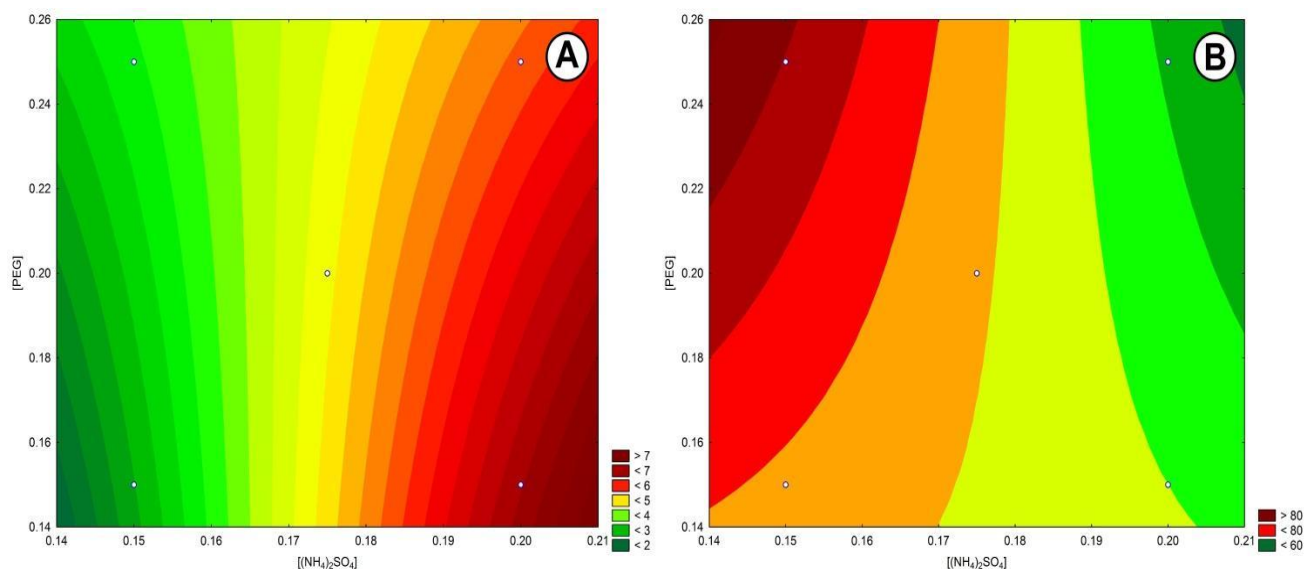


Figure 13 - Response contour of purification factor (A) and bromelain purification yield (B)

Thus, the curvature method is not useful for optimisation in this case, as a specific condition is necessary, with the best combination of both response variables. The solution was the use of a desirability function, which combines multiple variables into one response, denominated the “desirability response”, by selecting a value from 0 (one or more product characteristics are unacceptable) to 1 (all product characteristics are on target).

The combination of the desirability function with RSM creates a procedure denominated the desirability optimisation methodology (DOM).

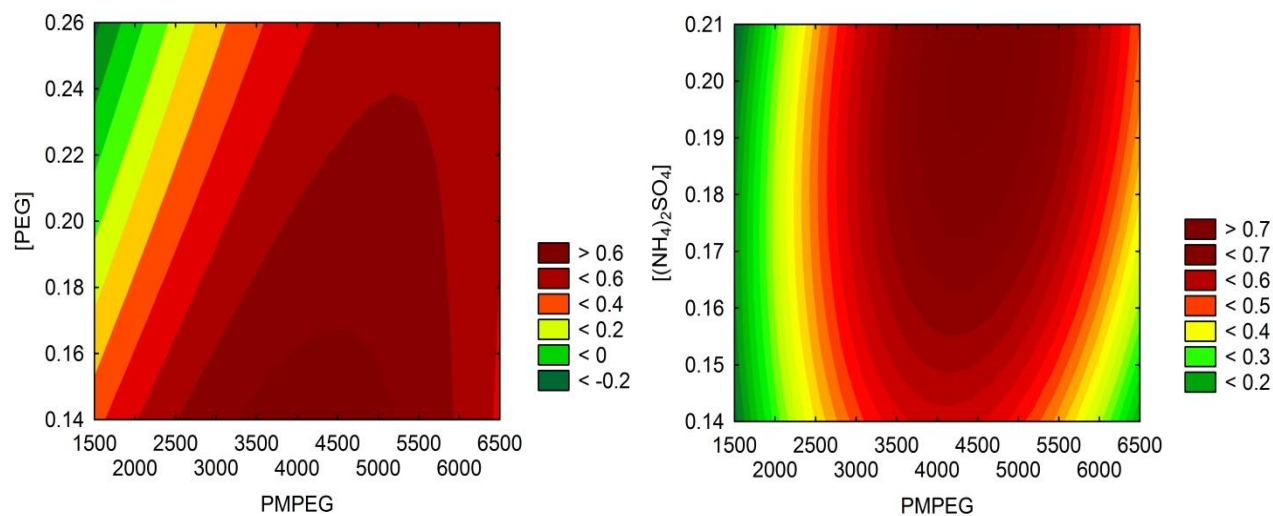


Figure 14 - Contour surface of desirability function for bromelain purification

DOM was used to eliminate PEG molar mass and delimitate the value range for all variables studied (Table 11) in the central composite design. As can be seen clearly in figure 14, the best results for this variable were achieved with a molar mass of 4000.

Table 11: 2² central composite design of uATPS (MMPEG 4000)

| Factor | | [(NH ₄) ₂ SO ₄] | [PEG] |
|--------|--------|--|--------|
| Levels | -1.414 | 29.14% | 10.86% |
| | -1 | 31.21% | 11.46% |
| | 0 | 36.21% | 12.93% |
| | 1 | 41.21% | 14.39% |
| | 1.414 | 43.28% | 15.00% |

Table 12 displays the results of the purification factor and bromelain yield with the central composite design. The best result ($P_F^t = 11.80$) was obtained with a PEG concentration of 10.86% and 36.21% ammonium sulphate saturation. These results are as high as those reported by (Silveira *et al.*, 2009) in a study using expanded bed adsorption and are higher than those obtained with reverse micelle systems (Hebbar *et al.*, 2008) or even conventional ATPS (Ratanapongleka, 2010).

Higher concentrations of ammonium sulphate would likely lead to bromelain precipitation due the salting-out effect, whereas a decrease in PEG concentration leads to a reduction in the excluded volume effect, allowing part of proteins, including bromelain, to be soluble in the PEG-enriched phase under these conditions.

Table 12: Encoded variables and results of central composite design (2^2 + three central points)

| $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ | [PEG] | P_F^t | $Y_E^t(\%)$ |
|--------------------------------|--------|---------|-------------|
| -1 | -1 | 6.67 | 90.09 |
| -1 | 1 | 4.38 | 85.71 |
| 1 | -1 | 9.98 | 94.95 |
| 1 | 1 | 6.10 | 74.28 |
| -1.414 | 0 | 5.74 | 91.17 |
| 1.414 | 0 | 9.15 | 94.78 |
| 0 | -1.414 | 11.80 | 87.36 |
| 0 | 1.414 | 10.42 | 68.07 |
| 0 | 0 | 7.50 | 88.51 |
| 0 | 0 | 7.71 | 89.07 |
| 0 | 0 | 7.66 | 88.47 |

Harris *et al.* (1998) report the precipitation of proteins in aqueous two-phase systems in a study on the purification of α_1 -antitrypsin (AAT) using PEG/ammonium sulphate and PEG/phosphate systems, but did not evaluate the benefits or the possibility of using the precipitation intentionally to eliminate unwanted proteins.

The partitioning behaviour of bromelain and the selectivity of the proposed method are seen in detail in the response contour graphs for P_F^S (figure 15) and Y_E^S (figure 16). As with the previous graphs, there was a reverse relation influence between the response variables. Curiously, however, these graphs have a common area of optimal results, which represents the region of possible operating conditions.

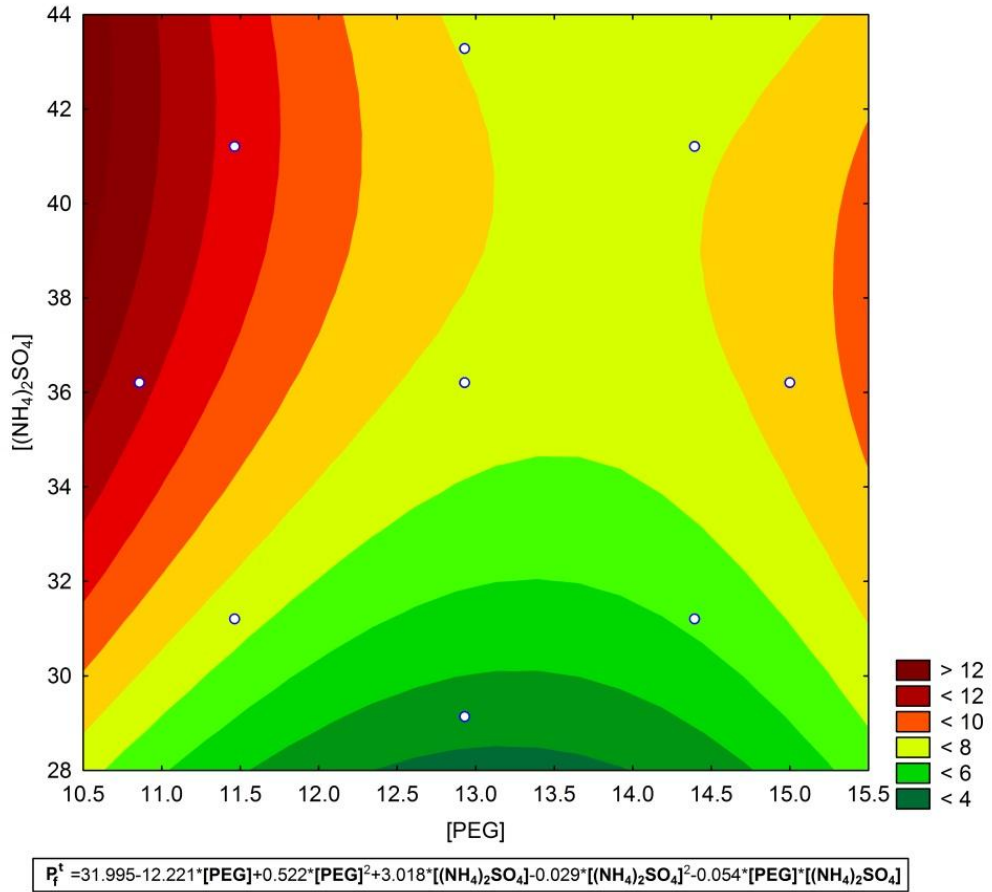


Figure 15 - Response contour of quadratic fit of purification factor in central composite design

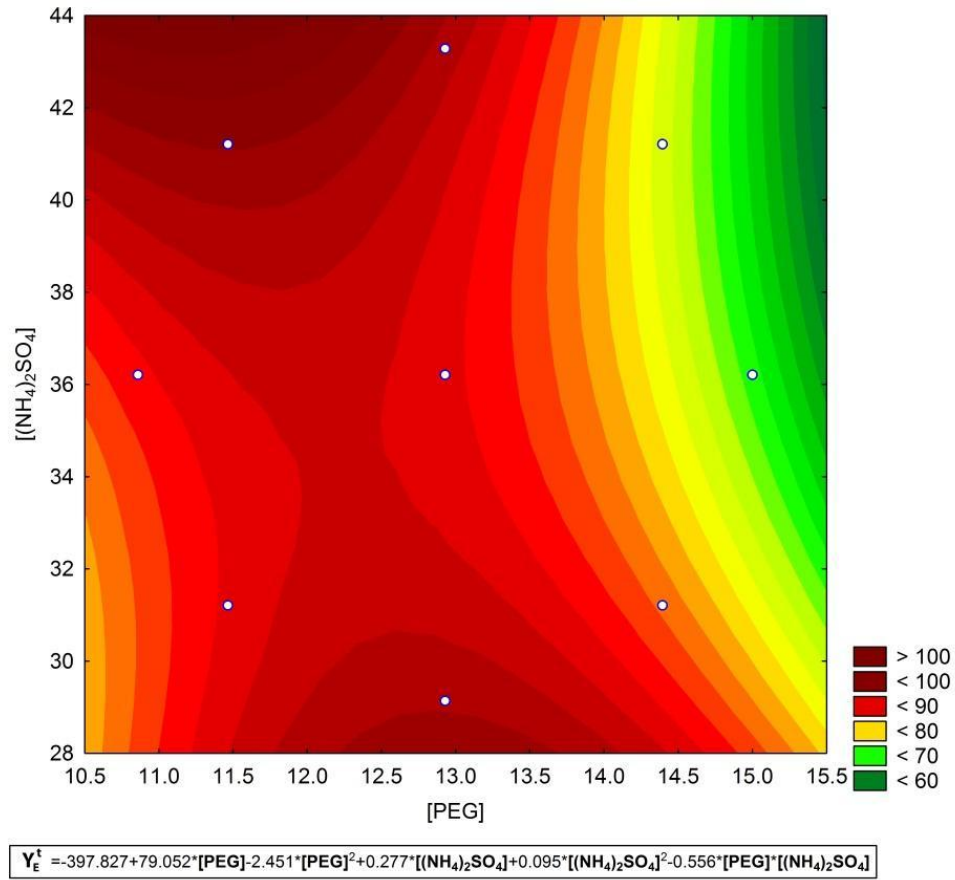


Figure 16 - Response contour of quadratic fit of bromelain purification factor in central composite design

Table 12 also shows the above-mentioned trade-off effect, which can be understood as the choice of best conditions between two inversely related extremes, e.g., the (0, 1.414)_{TABLE 12} experiment achieved one of the best results for the purification factor as well as the lowest yield, whereas the (-1.414, 0)_{TABLE 12} experiment achieved a low purification factor and high yield of bromelain purification. However, DOM was employed to determine the best operating region, i.e., that with the best combination of P_F^S and Y_E^S (figure 17).

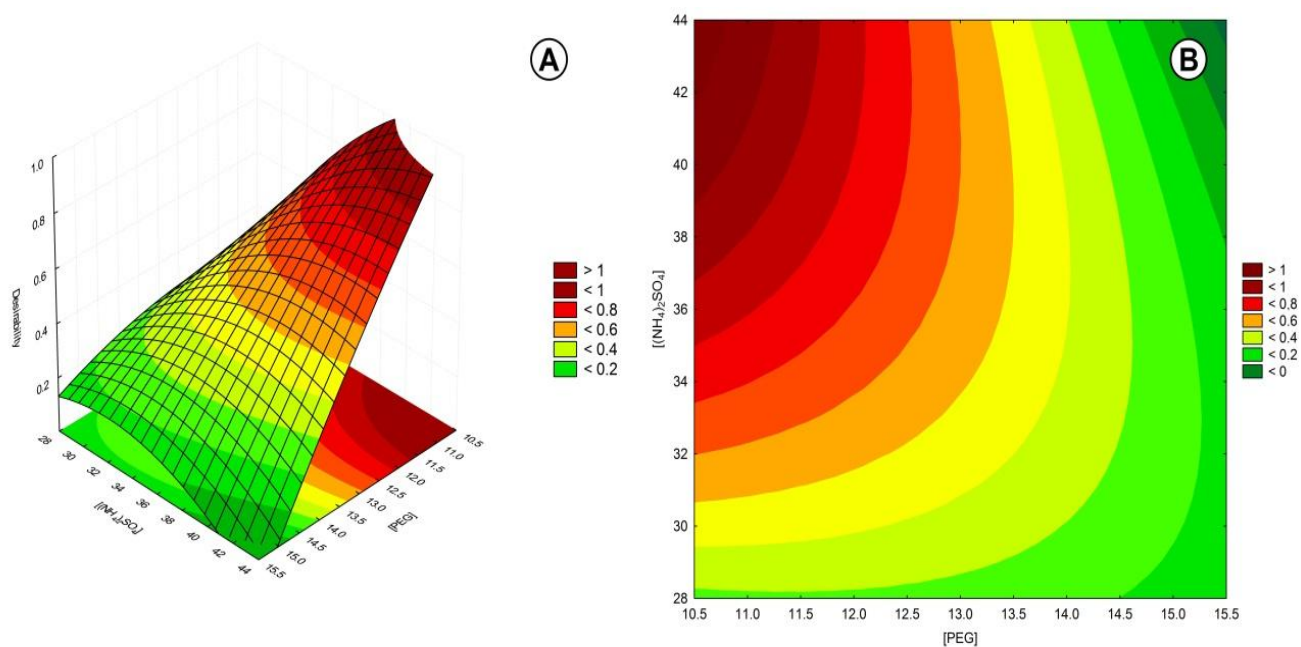


Figure 17 - Surface (A) and contour (B) plots of desirability function of central composite design

The area with the best operating conditions is that shown in figure 17.B, namely, 40 to 44% ammonium sulphate saturation and 10.5 to 11.5% PEG. Predicted values were calculated through the quadratic fit of the CCD results. Figure 18.A compares the purification factor values and figure 18.B compares bromelain purification yield values.

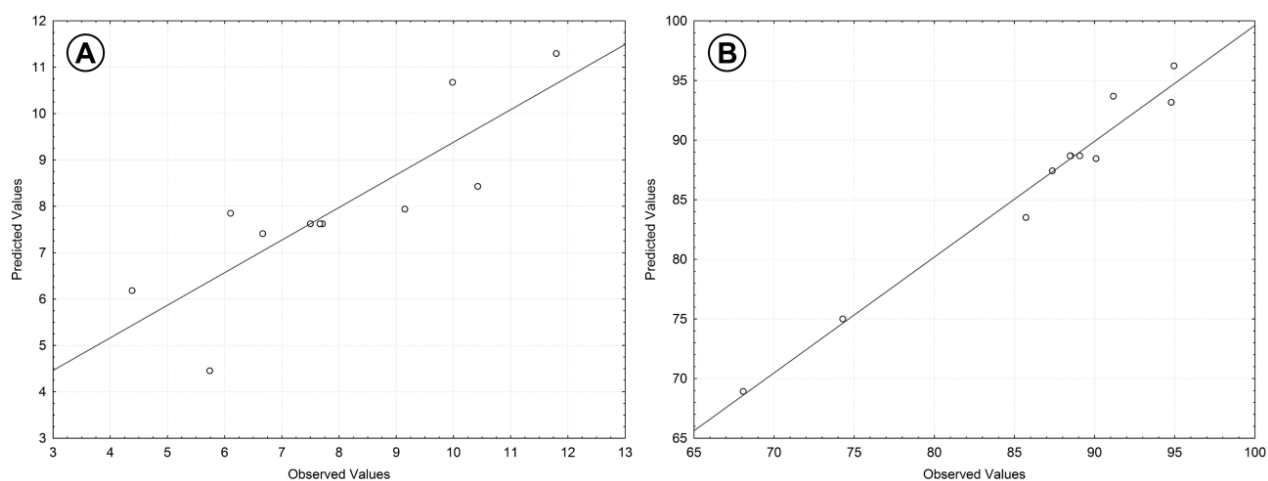


Figure 18 - Comparative graph of predicted versus observed values in uATPS

The quadratic regression was the one with the best fit for the achieved data. The mean square residual prediction error was 2.94 for P_F^S and 3.92 for Y_E^S . Perhaps a better fit could be achieved if other factors were included in uATPS studies, such as protein content, pH, temperature, etc.

5.3.4 Conclusions

The present study demonstrated that the purification of bromelain by aqueous two-phase systems could be enhanced through the integration with fractional precipitation in order to precipitate unwanted molecules and reduce the protein content. The resultant purification technique, denominated unconventional aqueous two-phase system (uATPS), displays good activity for the recovered fraction and an excellent purification factor in comparison to the results achieved with more sophisticated methodologies. Furthermore, the quadratic regression fit the data tolerably, even under the effect of the trade-off problem. Further studies are needed on the variables involved to determine whether the proposed modification to conventional ATPS can achieve even better results.

5.3.5 References

ALBERTSSON, P. A. **Partition of Cell Particles and Macromolecules**. 3. New York - NY: Wiley & Sons, 1986.

BALLS, A. K.; THOMPSON, R. R.; KIES, M. W. Bromelin. Properties and Commercial Production. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 33, n. 7, p. 950-953, 1941. ISSN 0019-7866.

BARROS NETO, B. D.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, E. **Como Fazer Experimentos - Aplicações na Ciência e na Indústria**. 4th. Bookman, 2010. 414 ISBN 9788577806522.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697.

CHATSWORTH, O. S. Cosmetic composition containing alpha hydroxyacids, salicylic acid, and enzyme mixture of bromelain and papain. **Biotechnology Advances**, v. 14, n. 4, p. 562, 1996.

DEVAKATE, R. V.; PATIL, V. V.; WAJE, S. S.; THORAT, B. N. Purification and drying of bromelain. **Separation and Purification Technology**, v. 64, n. 3, p. 259-264, 2009. ISSN 1383-5866.

DOONAN, S.; CUTLER, P. General Strategies. In: CUTLER, P. (Ed.). **Protein Purification Protocols**: Humana Press, v.244, 2004. p.1-13. (Methods in Molecular Biology™). ISBN 978-1-59259-655-3.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques. . In: (Ed.). **Guide to protein purification**. San Diego, USA.: Academic Press - Deutscher, 1990.

FEITOSA, E. et al. Phase diagrams of a CTAB/organic solvent/buffer system applied to extraction of enzymes by reverse micelles. **Journal of Chromatography B**, v. 862, n. 1-2, p. 58-63, 2008. ISSN 1570-0232.

FERREIRA, J. F.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. The effect of pH on bromelain partition from Ananas comosus by PEG4000/phosphate ATPS. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, p. 125-132, 2011. ISSN 1516-8913.

FILETI, A. M. F.; FISCHER, G. A.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Batch and continuous extraction of bromelain enzyme by reversed micelles. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 1225-1234, 2009. ISSN 1516-8913.

FILETI, A. M. F.; FISCHER, G. A.; TAMBOURGI, E. B. Neural modeling of bromelain extraction by reversed micelles. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 455-463, 2010. ISSN 1516-8913.

FISCHER, G. A. et al. Aqueous two-phase systems chromatography and biochemistry characterization of a enzyme from *Ananas comosus*. **Trend in Chromatography**, v. 3, p. 85-95, 2007.

GUPTA, R.; BRADDOO, S.; SAXENA, R. K. **Aqueous Two-Phase Systems : An Attractive Technology for Downstream Processing of Biomolecules**. Bangalore, INDE: Current Science Association, 1999. 4

HARRACH, T. et al. P182 bromelain: An immunomodulator with anticancer activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 1/2, p. 164, 1994.

HARRIS, D. P. et al. The application of aqueous two-phase systems to the purification of pharmaceutical proteins from transgenic sheep milk. **Bioseparation**, v. 7, n. 1, p. 31-37, 1998. ISSN 0923-179X.

HEBBAR, H. U.; SUMANA, B.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4896-4902, 2008. ISSN 0960-8524.

HEINICKE, R. M. Complementary Enzyme Actions in the Clotting of Milk. **Science**, v. 118, n. 3077, p. 753-754, December 18, 1953 1953.

LAROCCA, M.; ROSSANO, R.; SANTAMARIA, M.; RICCIO, P. Analysis of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] fruit proteinases by 2-D zymography and direct identification of the major zymographic spots by mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1334-1342, 2010. ISSN 0308-8146.

LOPES, F. L. G. et al. Concentration by membrane separation processes of a medicinal product obtained from pineapple pulp. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 457-464, 2009. ISSN 1516-8913.

MAURER, H. R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 9, p. 1234-1245, 2001. ISSN 1420-682X.

NARAYAN, A.; MADHUSUDHAN, M.; RAGHAVARAO, K. Extraction and Purification of Ipomoea Peroxidase Employing Three-phase Partitioning. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, n. 2, p. 263-272, 2008. ISSN 0273-2289.

OLIVEIRA, L. A.; PORTO, A. L. F.; TAMBOURGI, E. B. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 862-867, 2006. ISSN 0960-8524.

RABELO, A. P. B.; TAMBOURGI, E. B.; PESSOA, A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers. **Journal of Chromatography B**, v. 807, n. 1, p. 61-68, 2004. ISSN 1570-0232.

RATANAPONGLEKA, K. Recovery of Biological Products in Aqueous Two Phase Systems. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 1, n. 2, p. 7, 2010. ISSN 2010-0221.

SECOR, J., E. R. et al. Bromelain exerts anti-inflammatory effects in an ovalbumin-induced murine model of allergic airway disease. **Cellular Immunology**, v. 237, n. 1, p. 68-75., 2005.

SIGMA, C. C. **Catalog of Biochemical and chemical reagents**. 2012.

SILVEIRA, E. et al. Expanded bed adsorption of bromelain (E.C. 3.4.22.33) from *Ananas comosus* crude extract. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 26, p. 149-157, 2009. ISSN 0104-6632.

SOARES, P. et al. Studies on Bromelain Precipitation by Ethanol, Poly(Ethylene Glycol) and Ammonium Sulphate. **Chemical Engineering Transactions**, v. 24, p. 5, 2011. ISSN 1974-9791.

ZASLAVSKY, B. Y. Aqueous two-phase partitioning. In: DEKKER, M. (Ed.). **Physical chemistry and bioanalytical applications**. New York, 1995. p.221-290.

6 CONCLUSÕES

- O estudo de precipitação fracionada da bromelina com sulfato de amônio ($P_F = 4,44$) mostrou-se mais adequado para a purificação da bromelina do que a precipitação com etanol ($P_F = 2,07$);
- A bromelina extraída das cascas e folhas do *A. comosus* foi purificada, em todos os sistemas bifásicos aquosos formados, seletivamente para a fase superior (polimérica);
- Dentre os sais utilizados como constituintes dos SBAs convencionais, o sulfato de amônio forneceu melhores resultados de rendimento (88,24) e fator de purificação (10,78), superando os obtidos por sistemas PEG/Fosfatos ($P_F = 8,50$, $Y_E^s = 89,89$);
- O método de otimização de experimentos através de funções de desejabilidade são mais adequados à processos de separação do que método por curvatura, uma vez que se deve determinar as condições que fornecem a melhor combinação das variáveis de resposta;
- A purificação de biomoléculas através de sistemas bifásicos aquosos pode ser aprimorada através de sua integração com uma etapa de precipitação fracionária, levando a precipitação de espécies não desejadas, i.e., redução do conteúdo proteico;
- A técnica resultante desta integração, aqui denominada uATPS (do inglês, unconventional Aqueous Two-Phase Systems), apresentou ótimo desempenho na recuperação da fração bioativa, atingindo rendimento ótimo acima de 85% e fator de purificação de 11.80 vezes;
- O processo proposto extraiu e purificou a bromelina presente nos resíduos do processamento do abacaxi com sucesso, reduzindo o número de etapas necessárias para a produção (ver Anexo II) e descartando a necessidade de utilização do suco, com valor comercial, como matéria-prima;

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Ampliar o estudo para outras espécies da família Bromeliaceae, como o curauá (*Ananas erectifolius* L.B. SMITH);
- Utilização de efluente real, proveniente de indústria de beneficiamento do fruto;
- Caracterização do sistema bifásico (Construção das linhas de amarração);
- Estudos da purificação da bromelina através dos sistemas PEG/(NH₄)₂SO₄ em processos contínuos;
- Integração da purificação com um processo de filtração, para remoção do precipitado gerado;
- Realizar estudos cinéticos, de estabilidade e caracterização com a bromelina purificada.

8 ANEXOS

8.1 Anexo I – Percentual de Saturação do Sulfato de Amônio a 0 °C.

| Concentração Inicial de Sulfato de Amônio (Percentual de Saturação a 0 °C) | Percentual de Saturação (0 °C) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 | 95 | 100 | |
| | Sulfato de Amônio sólido (g) a ser adicionado a 1 litro de solução | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 106 | 134 | 164 | 194 | 226 | 258 | 291 | 326 | 361 | 398 | 436 | 476 | 516 | 559 | 603 | 650 | 697 | |
| 5 | 79 | 108 | 137 | 166 | 197 | 229 | 262 | 296 | 331 | 368 | 405 | 444 | 484 | 526 | 570 | 615 | 662 | |
| 10 | 53 | 81 | 109 | 139 | 169 | 200 | 233 | 266 | 301 | 337 | 374 | 412 | 452 | 493 | 536 | 581 | 627 | |
| 15 | 26 | 54 | 82 | 111 | 141 | 172 | 204 | 237 | 271 | 306 | 343 | 381 | 420 | 460 | 503 | 547 | 592 | |
| 20 | 0 | 27 | 55 | 83 | 113 | 143 | 175 | 207 | 241 | 276 | 312 | 349 | 387 | 427 | 469 | 512 | 557 | |
| 25 | | 0 | 27 | 56 | 84 | 115 | 146 | 179 | 211 | 245 | 280 | 317 | 355 | 395 | 436 | 478 | 522 | |
| 30 | | | 0 | 28 | 56 | 86 | 117 | 148 | 181 | 214 | 249 | 285 | 323 | 362 | 402 | 445 | 488 | |
| 35 | | | | 0 | 28 | 57 | 87 | 118 | 151 | 184 | 218 | 254 | 291 | 329 | 369 | 410 | 453 | |
| 40 | | | | | 0 | 29 | 58 | 89 | 120 | 153 | 187 | 222 | 258 | 296 | 335 | 376 | 418 | |
| 45 | | | | | | 0 | 29 | 59 | 90 | 123 | 156 | 190 | 226 | 263 | 302 | 342 | 383 | |
| 50 | | | | | | | 0 | 30 | 60 | 92 | 125 | 159 | 194 | 230 | 268 | 308 | 348 | |
| 55 | | | | | | | | 0 | 30 | 61 | 93 | 127 | 161 | 197 | 235 | 273 | 313 | |
| 60 | | | | | | | | | 0 | 31 | 62 | 95 | 129 | 164 | 201 | 239 | 279 | |
| 65 | | | | | | | | | | 0 | 31 | 63 | 97 | 132 | 168 | 205 | 244 | |
| 70 | | | | | | | | | | | 0 | 32 | 65 | 99 | 134 | 171 | 209 | |
| 75 | | | | | | | | | | | | 0 | 32 | 66 | 101 | 137 | 174 | |
| 80 | | | | | | | | | | | | | 0 | 33 | 67 | 103 | 139 | |
| 85 | | | | | | | | | | | | | | 0 | 34 | 68 | 105 | |
| 90 | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 34 | 70 | |
| 95 | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 35 | |
| 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | |

Reimpresso de England e Seifter (1990), que adaptou de Dawson et. al. (1987).

8.2 Anexo II – Fluxograma do Processo Convencional e do uATPS para a Produção de Bromelina

